
Bachelorarbeit

Aline Mergner

**Vergleich und Optimierung
verschiedener Primerdesigns zur
Detektion von SNPs mittels Allel-
spezifischer PCR**

Mittweida, 25.08 2013

Bachelorarbeit

Vergleich und Optimierung verschiedener Primerdesigns zur Detektion von SNPs mittels Allel- spezifischer PCR

Autor:

Aline Mergner

Studiengang:

Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

BI10w1-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbie Wünschiers

Zweitprüfer:

Diplom-Biologe Michael Kohl

Einreichung:

Mittweida, 25.08.2013

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 29.08.2013

Bibliographische Beschreibung:

Mergner, Aline: Vergleich und Optimierung verschiedener Primerdesigns zur Detektion von SNPs mittels Allel-spezifischer PCR. - 2013. - Inhaltsverzeichnis 3 S., Abbildungsverzeichnis 1 S., Tabellenverzeichnis 2 S., Diagrammverzeichnis 1 S., Abkürzungsverzeichnis 2 S., Literaturverzeichnis 2 S., Inhalt 59 S. , Anhang 14 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät MNI, Bachelorarbeit, 2013

Englischer Titel

Comparison and optimization of various primer designs for the detection of SNPs using allele-specific PCR

Kurzbeschreibung:

Diese Arbeit befasst sich mit dem Vergleich und der Optimierung verschiedener Primerdesigns zur Detektion von SNPs mittels Allel-spezifischer PCR. Dabei wurden zwei verschiedene Primerdesigns erzeugt, die auf der Grundlage eines zuvor auf Funktionalität getesteten Primerdesigns basieren. Zur stärkeren Signal-Auftrennung wurde dem zweiten Primerdesign ein Tail hinzugefügt. Das dritte Primerdesign besteht aus einer Ankersequenz ($T_m > 75^\circ\text{C}$), einem nicht zur genomischen Sequenz komplementären Spacer und einem Sequenz-spezifischen 3'-Ende. Dabei wurde die Orientierung der Primer aufgrund der Nachbar-SNPs von A2690C geändert. Die Sequenzierung ergab keine weiteren Mutationen, außer den gewünschten, innerhalb der Primer-Konstrukte. Somit wird die Erzeugung von Nullallelen nur durch die Fehlpaarung einer Base hervorgerufen. Die Funktionalität des Primerdesign 3 konnte nicht bestätigt werden. Im Vergleich schneidet das Primerdesign 1 etwas besser ab als das Primerdesign 2. Der Ausfall tritt dabei beim Primerdesign 1 schon ab einer Annealing-Temperatur von 67°C ein. Zudem entfällt die Erzeugung und der Abgleich des Tails mit den entstehenden Produkten. Für die Multiplex-PCR ist eine Kombination beider Primerdesigns denkbar und vermutlich sinnvoll, da über die Tail-Sequenzen Manipulationen zur Anpassung der Eigenschaften der Primer vorgenommen werden können und die Abstimmung zwischen verschiedenen SNP-Primer-Trios gegebenenfalls erleichtert wird. Bestätigt sich die Funktionalität der Allel-spezifischen PCR im Multiplex-Verfahren, so könnte diese Methode die in der Rechtsmedizin übliche Single Base Extension ablösen. Dadurch würde sich eine starke Senkung der Kosten und des Zeitaufwandes ergeben.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. J. Dreßler für die Möglichkeit bedanken, am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Leipzig meine Bachelorarbeit anfertigen zu dürfen.

Mein größter Dank gilt Herrn Diplom-Biologen Michael Kohl für die Bereitstellung des Themas und seiner unermüdlichen Geduld und Bereitschaft bei der Betreuung. Auch möchte ich mich für die zahlreichen konstruktiven Gespräche und die vielen Hinweise bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Bei meinem Hochschulbetreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbke Wünschiers möchte ich mich für die Betreuung meiner Bachelorarbeit und die vielen aufmunternden Worte bedanken. Zudem bedanke ich mich bei M. Sc. Dipl.-Ing. (FH) René Kretschmer und Dipl. Ing. (FH) Sandra Feik für die tolle Betreuung über das gesamte Studium.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. J. Edelmann und Dr. rer. med. M. Nastainczyk-Wulf für Ihre Hilfsbereitschaft und konstruktiven Anregungen bedanken. Auch bei allen anderen Arbeitskollegen möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft im Labor und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank all denen, die ich nicht namentlich genannt habe und meinem Freund Daniel Allich. Ihm danke ich dafür, dass er mir in diesem stressigen Zeitraum den Rücken von allen Verpflichtungen freigehalten hat. Danke!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	V
Diagrammverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Allel-spezifische PCR.....	2
1.2 PCR-Optimierung	3
1.3 Primerdesign	4
1.4 Kapillarelektrophorese.....	5
2 Zielstellung	7
3 Material.....	8
3.1 Chemikalien	8
3.2 Material	9
3.3 Geräte und Software	9
4 Methoden	11
4.1 Primerdesign	11
4.1.1 Sequenzbeschaffung und Sequenzmanipulations-Tools.....	11
4.1.2 Ermittlung der Schmelztemperatur	11
4.1.3 Erzeugung des Tails/Spacer	12
4.1.4 Primerdesign 1	13
4.1.5 Primerdesign 2	14
4.1.6 Primerdesign 3	14
4.2 DNA-Isolierung nach Macherey-Nagel.....	18
4.3 Polymerase Kettenreaktion	19
4.3.1 DNA-Quantifizierung mittels Real-Time PCR.....	19
4.3.2 Allel-spezifische PCR.....	20
4.3.3 Sequenzierung nach Sanger	26
4.4 Kapillargelelektrophorese	29
4.4.1 Allel-spezifische PCR.....	29

4.4.2 Sequenzierung nach Sanger	29
5 Ergebnisse.....	30
5.1 Sequenzdetails des Primerdesigns	30
5.2 Primerdesign 1	31
5.2.1 Bestimmung der Annealing-Temperatur bei aufgetrennten Primern	31
5.2.2 Nachweis des Ausfalls unter Verwendung des Primer-Mix	33
5.2.3 Verschiedene DNA-Konzentrationen in Verbindung mit der DNA-Loci- Variante AC	34
5.2.4 Verschiedene revA-Konzentrationen für die DNA-Loci-Variante AC	35
5.2.5 Zehnfache Durchführung der Reaktion für die DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei gleichbleibenden Bedingungen.....	36
5.3 Primerdesign 2	40
5.3.1 Ausschluss unerwünschter Signale.....	40
5.3.2 Verschiedene revC_tail-Konzentrationen für die DNA-Loci-Variante AC	41
5.3.3 Zehnfache Durchführung der Reaktion für die DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei gleichbleibenden Bedingungen.....	42
5.3.4 Verschiedene DNA-Konzentrationen in Verbindung mit der DNA-Loci- Variante AC	43
5.4 Primerdesign 3	45
5.5 Sequenzierung nach Sanger	46
6 Diskussion.....	49
6.1 Qualität der Primerdesigns 1, 2 und 3.....	50
6.2 Primerdesign 1	51
6.3 Primerdesign 2	52
6.4 Primerdesign 3	52
6.5 Vergleich der Primerdesigns 1 und 2.....	53
6.6 Sequenzierung nach Sanger	53
7 Ausblick	55
8 Zusammenfassung	56
9 Summary.....	58
Literaturverzeichnis	60
Anhang.....	62

1 DNA-Quantifizierung	62
2 Diagrammdetails	62
2.1 Diagramm 1 S.35 - PD1- Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen.....	62
2.2 Diagramm 2 S.36 - PD1 - Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revA-Konzentrationen.....	64
2.3 Diagramm 3 S.37 - PD1 - Zehnfache Durchführung der Reaktion in Verbindung mit den DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei konstanten Bedingungen (AT 66°C).....	65
2.4 Diagramm 4 S.38 PD1 - Zehnfache Durchführung der Reaktion in Verbindung mit der DNA-Loci-Variante AC bei konstanten Bedingungen (AT 66°C, 67°C und 68°C).....	67
2.5 Diagramm 5 S.39 - PD1 - Zehnfache Durchführung der Reaktion in Verbindung mit der DNA-Loci-Variante AA, AC und CC unter Verwendung der endgültigen Bedingungen für dieses Primerdesign	69
2.6 Diagramm 6 S.42 - PD2 - Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revC_tail-Konzentrationen.....	71
2.7 Diagramm 7 S.43 - PD2 - Nachweis des Ausfalls durch zehnfache Durchführung der Reaktion bei gleichen Bedingungen unter Verwendung der DNA-Loci- Varianten AA, AC und CC	71
2.8 Diagramm 8 S.44 - PD2 - Durchschnittliche Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen	73
3 Sequenzdetails aus der Sequenzierung nach Sanger.....	75
Selbstständigkeitserklärung.....	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erzeugung von Nullallelen mithilfe konkurrierender modifizierter Primer.	3
Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese [verändert nach Gey 2008].....	6
Abbildung 3: Positionsbestimmung des SNPs A2690C auf dem Chromosom.	14
Abbildung 4: Richtungswechsel der Orientierung der Primer des Primerdesign 3.....	16
Abbildung 5: Zwei verschiedene mögliche Intervalle für die Ankersequenz des Primerdesign 3.....	17
Abbildung 6: PD1 - Signalstärke der DNA-Loci-Variante CC in Abhängigkeit der Annealing-Temperatur (AT 63°C, 66°C und 69°C).	32
Abbildung 7: PD1 - Nachweis des Primer-Ausfalls bei einer Annealing-Temperatur von 66°C unter Verwendung des Primer-Mixes (for + revA + revC) in Verbindung mit den DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC.....	33
Abbildung 8: PD2 - Nachweis des Primer-Ausfalls im Primer-Mix bei aufgespaltenen PCR-Zyklen.....	40
Abbildung 9: Hintergrundrauschen im Sequenzierungsergebnis der im Kit mitgelieferten Kontroll-DNA.....	46
Abbildung 10: Darstellung des Sequenzierungsergebnis an der Position des SNP A2690C der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC.	47
Abbildung 11: Sequenzierte Basen an den Positionen, an denen laut NCBI weitere Polymorphismen auftreten können.....	48
Abbildung 12: Mögliche Ausprägung einer Leserasterverschiebung (roter Kreis 1) und mögliche Ausprägung einer Fehlhybridisierung (roter Kreis 2).	50
Abbildung 13: Beispiel einer Fehlhybridisierung beim Primerdesign 3.	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen und Eigenschaften der auf Funktionalität getesteten Primer auf deren Grundlage das Primerdesign 1 und 2 basiert.....	13
Tabelle 2: Auswahl der richtigen Zeile in der dbSNP mit Hilfe der zuvor bestimmten Chromosomenposition.	15
Tabelle 3: Darstellung der Nachbar-SNPs 100 Basen „Up- und Downstream“ des SNPs A2690C.	16
Tabelle 4: PCR-Protokoll für die DNA-Quantifizierung mittels Real-Time PCR.	19
Tabelle 5: Pipettierschema für die Allel-spezifische PCR.....	20
Tabelle 6: Das empfohlene PCR-Programm von Qiagen, welches für die Allel-spezifische PCR Anwendung fand.	21
Tabelle 7: Zusammenfassung der veränderten PCR-Parameter für das Primerdesign 1.	21
Tabelle 8: Zusammenfassung der veränderten PCR-Parameter für das Primerdesign 2.	22
Tabelle 9: Zusammenfassung der veränderten PCR-Parameter für das Primerdesign 3.	25
Tabelle 10: Pipettierschema zur Vervielfältigung der Templates für die Sequenzierungs-PCR.....	26
Tabelle 11: PCR-Protokoll zur Erzeugung und Vervielfältigung des zu sequenzierenden DNA-Fragmentes.	27
Tabelle 12: Pipettierschema für die Sequenzierungsreaktion.....	27
Tabelle 13: PCR-Protokoll für die Sequenzierungsreaktion.....	28
Tabelle 14: Sequenzdetails und Eigenschaften der Primer für alle drei Primerdesigns.	30
Tabelle 15: Ermittelte theoretische Produktlänge, die durch die Primer der drei verschiedenen Primerdesigns erzeugt wurden.	31
Tabelle 16: PD3 - Signalstärke der DNA-Loci-Variante CC in Verbindung mit der Primer-Kombination forA + rev und der DNA-Loci-Variante AA in Verbindung mit der Primer-Kombination forC + rev.	45
Tabelle 17: In der Real-Time PCR ermittelte DNA-Konzentration.	62

Tabelle 18: PD1 - Werte zum Diagramm 1. Durchschnittliche Signalstärke (n = 3) der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Mengen (2 ng; 1ng; 0,5 ng; 0,25 ng; 0,125 ng).	62
Tabelle 19: PD1 - Werte zum Diagramm 2. Durchschnittliche Signalstärke (n = 3) der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revA-Konzentrationen.	64
Tabelle 20: PD1 - Werte zum Diagramm 3. Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei konstanten Bedingungen (AT 66°C).....	65
Tabelle 21: PD1 - Werte zum Diagramm 4. Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Variante AC bei konstanten Bedingungen (AT 66°C, 67°C und 68°C).	67
Tabelle 22: PD1 - Werte zum Diagramm 5. Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Varianten AA; AC und CC unter Verwendung der endgültigen Bedingungen, die für dieses Primerdesign ermittelt wurden.	69
Tabelle 23: PD2 - Werte zum Diagramm 6. Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revC_tail-Konzentrationen.	71
Tabelle 24: PD2 - Werte zum Diagramm 7. Nachweis des Ausfalls durch zehnfache Durchführung der Reaktion bei gleichen Bedingungen unter Verwendung der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC.....	71
Tabelle 25: PD2 - Werte zum Diagramm 8. Durchschnittliche Signalstärke (n = 3) der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Mengen (2 ng; 1 ng; 0,5 ng; 0,25 ng; 0,125 ng).	73
Tabelle 26: Sequenzen der Sequenzierungsreaktion für die DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC.	75

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: PD1 - Durchschnittliche Signalstärke (n = 3) der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Mengen (2 ng; 1ng; 0,5 ng; 0,25 ng; 0,125 ng).....	35
Diagramm 2: PD1 - Durchschnittliche Signalstärke (n = 3) der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revA-Konzentrationen.	36
Diagramm 3: PD1 - Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei gleichbleibenden Bedingungen (AT 66°C).	37
Diagramm 4: PD1 - Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Variante CC bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (AT 66°C, 67°C und 68°C).	38
Diagramm 5: PD1 - Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei gleichbleibenden Bedingungen (AT 67°C).	39
Diagramm 6: PD2 - Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revC_tail-Konzentrationen.	42
Diagramm 7: PD2 - Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei gleichbleibenden Bedingungen.....	43
Diagramm 8: PD2 - Durchschnittliche Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Mengen (2 ng; 1ng; 0,5 ng; 0,25 ng; 0,125 ng).	44

Abkürzungsverzeichnis

2x	-	zweifach
6-FAM	-	6-Carboxyfluorescein
A	-	Adenin
AE-Puffer	-	Elutionspuffer
ARMS	-	System der amplifizierungsresistenten Mutationen (engl. amplification refractory mutation system)
asPCR	-	Allel-spezifische PCR
AT	-	Annealing-Temperatur
B3	-	Lysepuffer
B5	-	Waschpuffer
BE	-	Elutionspuffer
Bez.	-	Bezeichnung
bp	-	Basenpaar/Basenpaare
BW	-	Waschpuffer
C	-	Cytosin
cPM	-	Primer-Konzentration in der Reaktion
cSNP	-	codierender SNP
dNTP	-	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ExoI	-	<i>Exonuclease I</i>
for	-	Forward-Primer des Primerdesign 1 und 2
forA	-	Wildtyp-Forward-Primer des Primerdesign 3
forC	-	mutierter Forward-Primer des Primerdesign 3
G	-	Guanin
GC-Gehalt	-	Gehalt an Guanin und Cytosin
gSNP	-	Gen-assoziiertes SNP
HEX	-	Hexachlorfluorescein
mtSNP	-	mitochondrialer SNP
NCBI	-	National Center for Biotechnology Information
PASA	-	PCR-Amplifikation von spezifischen Allelen
PCR	-	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)

PD	-	Primerdesign
pSNP	-	Phänotyp-relevanter SNP
revA	-	Wildtyp-Reverse-Primer Adenin des Primerdesign 1
revA_tail	-	Wildtyp-Reverse-Primer Adenin des Primerdesign 2
revC	-	mutierter Primer Cytosin des Primerdesign 1
revC_tail	-	mutierter Primer Cytosin des Primerdesign 2
rev	-	Reverse-Primer des Primerdesign 3
rfu	-	relative Fluoreszenzeinheiten (engl. relative fluorescence units)
rSNP	-	random SNP
rpm	-	Umdrehungen pro Minute (engl. rotation per minutes)
SAP	-	<i>Shrimp Alkaline</i> Phosphatase
SBE	-	Einzelbasen-Verlängerung (engl. single base extension)
SNP	-	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. single nucleotide polymorphism)
STR	-	kurze sich wiederholende DNA-Sequenzen (engl. short tandem repeat)
T	-	Thymin
T1	-	Lysepuffer
Taq	-	<i>Thermus aquaticus</i>
T _m	-	Schmelztemperatur
un/μl	-	Einheit/μl (engl. unit/μl)
ZA	-	Zyklenanzahl

1 Einleitung

Punktmutationen, auch als „Single nucleotide polymorphism (SNP)“ bezeichnet, sind aus der Rechtsmedizin nicht mehr wegzudenken. SNPs gehören zu den binären Polymorphismen und besitzen eine geringe Mutationsrate. Dabei handelt es sich um zufällig über das gesamte menschliche Genom verteilte Punktmutationen, d.h. an einer bestimmten Position im Genom treten in einer Population verschiedene Sequenzvarianten (Allele) auf. Eine Mutation muss zu mindestens 1% in einer Bevölkerungsgruppe auftreten, um als Polymorphismus zu gelten. SNPs machen 90% aller Polymorphismen im menschlichen Genom aus und treten statistisch gesehen alle 300 bis 1000 Basenpaare auf. Die möglichen Sequenzvarianten treten nicht gleichverteilt auf, d.h. zwei Drittel aller Austausche sind C>T oder G>A. Des Weiteren sind C>A, G>T, C>G, G>C, T>A und A>T möglich [Kowal 2007]. SNPs können in „random“ SNPs (rSNPs), Gen-assoziierte SNPs (gSNPs), codierende SNPs (cSNPs) und Phänotyp-relevante SNPs (pSNPs) unterschieden werden. Je nachdem, an welchem Ort dieser Basenaustausch erfolgt, können unterschiedliche Auswirkungen die Folge sein [Foernzler 2000]. Eine weitere Einteilung der SNPs kann nach der Lage auf dem Genom erfolgen. Dabei wird in mitochondriale SNPs (mtSNPs), gonosomale SNPs und autosomale SNPs unterschieden. Ein Beispiel für beide Einteilungsformen ist der autosomale SNP A2690C. Dabei handelt es sich um einen cSNP, denn dieser liegt in einer codierenden Region des Gens KCNH2 auf Chromosom 7 des menschlichen Genoms.

SNP-Analysen können beispielsweise bei Identifizierungsuntersuchungen und Verwandtschaftsanalysen ergänzend zur Untersuchung von STR-Systemen („Short tandem repeat“) hinzugezogen werden. Des Weiteren werden SNPs bei geringen DNA-Mengen stark beschädigten zellulären Materials oder für die postmortale Diagnostik herangezogen [Dettmeyer & Verhoff 2011].

1.1 Allel-spezifische PCR

Mutationen können in der forensischen DNA-Analytik auch zu einem Problem werden, denn Blut und Speichel desselben Menschen können sich durch eine Mutation in einem Allel unterscheiden. Wenn z.B. Spur- und Speichelpollen in unterschiedlichen Laboren analysiert werden und diese Labore für ein bestimmtes STR-System unterschiedliche Primer, d.h. unterschiedliche Kits verwenden, besteht die Möglichkeit, dass in einem der beiden Kits eine Inkompatibilität in der Primer-Bindungsregion auftritt. Dabei kann durch den Ausfall eines Allels eine Homozygotie vorgetäuscht werden, obwohl es sich um keine handelt. Allele, die aufgrund einer Mutation in der Primer-Bindungsregion ausfallen, werden auch als Nullallele bezeichnet [Dettmeyer & Verhoff 2011].

Dieser scheinbare Nachteil kann durch die Allel-spezifische PCR (asPCR) nutzbar gemacht werden. Die Allel-spezifische PCR wird auch synonym als PCR-Amplifikation von spezifischen Allelen (PASA) oder als ARMS-PCR „amplification-refractory mutation system“ bezeichnet. Bei dieser Form der PCR werden Primer generiert, die sich in einer Base am 3'-Ende unterscheiden. Dabei spielt die Position des SNPs innerhalb der Primer-Sequenz eine Rolle, denn je näher die Mutation am 3'-Ende liegt, desto wahrscheinlicher wird es, dass die Fehlpaarung von der Polymerase nicht mehr toleriert wird und keine Amplifikation in der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) stattfindet [Mülhardt 2009]. Diese sich in einer Base unterscheidenden Primer werden mit einem gemeinsamen Primer in zwei getrennte PCR-Reaktionen eingesetzt. Der Genotyp lässt sich durch anschließende Auftrennung oder Detektion der PCR-Produkte charakterisieren [Gressner & Arndt 2013; URL-1].

In dieser Arbeit wurde die asPCR etwas abgewandelt. Dabei wurden die zwei getrennten PCR-Reaktionen zu einer zusammengefasst. Des Weiteren wurden Primer erstellt, bei denen entweder die mutierte Base oder die Wildform der Base des SNPs A2690C an dritter Stelle des 3'-Endes liegt. Bei dem SNP A2690C handelt es sich um einen codierenden SNP (cSNP) bzw. autosomalen SNP, der in dieser Arbeit als Modell dienen soll. Für diesen SNP liegen Proben vor, für welche die drei DNA-Loci-Varianten - homozygot AA, heterozygot AC und homozygot CC - bereits über die SBE-Methode (single base extension) nachgewiesen wurden. Dabei soll mit dieser Methode, wie in Abbildung 1 S.3 dargestellt, erreicht werden, dass der Primer ein Nullallel erzeugt,

wenn die Base an dritter Stelle des 3'-Endes nicht übereinstimmt. Liegt zum Beispiel für den SNP A2690C die Allelvariante homozygot AA vor, dann sollte nur die Wildtypvariante des Primers an die Sequenz binden und ein Fragment innerhalb der PCR erzeugen. Die zur Mutation komplementäre Primer-Variante fällt in diesem Fall aus. Andererseits sollten von beiden Primern möglichst ähnlich viele Amplifikate erzeugt werden, wenn es sich um die Allelvariante heterozygot AC handelt. In diesem Fall liegen beide Formen des Allels vor, und es bindet sowohl die Wildtyp- als auch die Mutationsvariante des Primers. Dabei werden zwei Amplifikate in der PCR erzeugt, die aufgrund von unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen der eingesetzten Primer unterschieden werden können. Ein Ausfall der Wildtyp Primer-Variante hingegen wird erwartet, wenn die Allelvariante homozygot CC vorliegt.

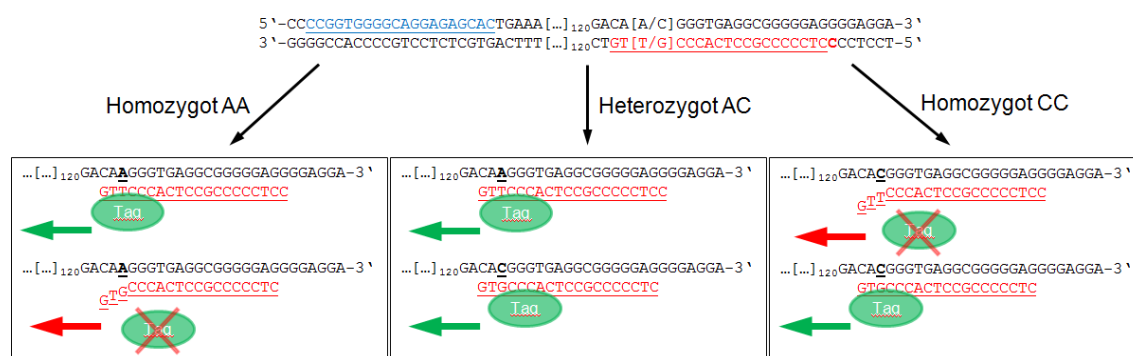


Abbildung 1: Erzeugung von Nullallelen mithilfe konkurrierender modifizierter Primer.

1.2 PCR-Optimierung

Die Polymerase-Kettenreaktion ist die beste Methode, wenn es um die Amplifikation von geringsten oder stark beschädigten DNA-Mengen geht. Dabei können DNA-Abschnitte von 100 bis 3000 bp Länge in kürzester Zeit vervielfältigt werden. Ein Picogramm (10^{-12} g) DNA reicht rein theoretisch schon aus, um ein gewünschtes Fragment zu amplifizieren [Clark & Pazdernik 2009]. Doch auch wenn es zunächst einfach erscheint, so gibt es viele Faktoren, die über den Erfolg der PCR entscheiden.

Da, wie eben erwähnt, viele Einflussfaktoren existieren, wurde ein Kit gewählt, welches die PCR-Optimierung vereinfachen soll. Das QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit stellt dabei einen 2x „ready-to-use“ Mastermix zur Verfügung, der voroptimierte

Konzentrationen der HotStarTaq Plus DNA-Polymerase, des Magnesiumchlorids (MgCl_2), der dNTPs sowie des PCR-Puffers enthält, wodurch die zu optimierenden Parameter verringert und die Reproduzierbarkeit erhöht werden soll.

Somit verbleiben zur Optimierung der Bedingungen die Wahl der Annealing-Temperatur, welcher in den Versuchen eine entscheidende Bedeutung zukommt, die Konzentration der einzusetzenden Primer sowie die Elongationszeit. Dabei richtet sich die Annealing-Temperatur nach der Schmelztemperatur der in der PCR eingesetzten Primer. Liegt die Annealing-Temperatur oberhalb dieser Schmelztemperatur, binden weniger als 50% der Primer. Aus diesem Grund sollte diese Temperatur theoretisch 5 bis 10°C niedriger als die Schmelztemperatur der Primer sein. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass das Primerannealing durch die Konzentration der Magnesiumionen (Mg^{2+}) beeinflusst wird. Einen weiteren zu beachtenden Faktor stellt die Elongationszeit dar. Diese ist von der in der PCR eingesetzten Polymerase abhängig. Ist die Elongationszeit zu kurz, kann die Polymerase ihre Arbeit nicht beenden. Wird hingegen die Elongationszeit zu lang eingestellt, kann es passieren, dass ungewollte Reaktionen stattfinden. Auch stellt sich die Frage nach einer Ölüberschichtung des PCR-Reaktionsvolumen, denn bei kleinen Volumina kann die Verdunstung - auch bei Verwendung von Heizdeckeln, die während der Reaktion stattfindet - zu einer starken Konzentrationsveränderung und somit zur Inhibierung der Reaktion führen [Mülhardt 2009].

1.3 Primerdesign

Wie bei der PCR-Optimierung gibt es auch beim Primerdesign viele Faktoren, die berücksichtigt werden sollten, denn diese entscheiden am stärksten über das Gelingen der Amplifikation. Ein Primer sollte zwischen 18 bis 30 bp lang sein und einen GC-Gehalt von 40% bis 60% aufweisen. Bei einer Amplifikation von sehr langen Fragmenten kann dieser Bereich auf 25 bis 35 bp ausgedehnt werden. Des Weiteren sollte die Abfolge von mindestens vier gleichen Basen aufeinander vermieden werden, um eine Fehlhybridisierung und eine Leserasterverschiebung zu vermeiden. Die Schmelztemperatur der Primer sollte, um ausreichend hohe Annealing-Temperaturen zu

erlauben, zwischen 55°C und 80°C liegen. Ein bis zwei Guanin- oder Cytosin-Basen am 3'-Ende der Primers führen zur verbesserten Bindung und Elongation. Dabei sollte die Anzahl auf maximal drei beschränkt werden, da eine größere Anzahl fehlhybridisierte Primer stabilisieren würde. Dadurch steigt außerdem die Gefahr, unspezifische Produkte zu erhalten. Weiterhin ist es empfehlenswert, die Spezifität der Primer zu prüfen, denn je mehr homologe Sequenzen für einen Primer gefunden werden, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, unerwünschte Amplifikationsprodukte zu erhalten. Zu beachten ist, dass mit zunehmender Komplexität der Primer-Sequenz die Wahrscheinlichkeit für die Amplifizierung von Artefakten steigt. Dem kann durch möglichst hohe Annealing-Temperaturen entgegengewirkt werden. Des Weiteren sollten Sekundärstrukturen innerhalb der Primer-Sequenz - wie beispielsweise Haarnadeln - vermieden werden, weil dadurch die Wahrscheinlichkeit der Hybridisierung des Primers mit der Template-DNA verringert wird. Ein weiteres Kriterium ist die Selbstkomplementarität des Primer-Paars an den 3'-Enden. Ist die Komplementarität zu hoch, führt dies zur Hybridisierung der Primer miteinander. Dabei würde einer der Primer als Template für den anderen dienen und anstelle des gewünschten Amplifikates Primerdimere erzeugen [Mülhardt 2009].

1.4 Kapillarelektrophorese

Bei der Kapillarelektrophorese handelt es sich um eine Trennmethode, die auf der Wanderung von Teilchen beruht. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen wird dabei durch deren Masse, Volumen und durch deren Ladung beeinflusst. Außerdem kann die Wanderungsgeschwindigkeit über den pH-Wert, die Temperatur oder die Ionenstärke des verwendeten Puffers reguliert werden. Durch das Anlegen eines Gleichstromfeldes wandern die Moleküle zu dem Pol, der ihrer Ladung entgegengesetzt ist. In Abbildung 2 S.6 ist ein schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese dargestellt. Dabei beinhaltet diese Apparatur zwei Puffergefäße, welche durch eine Hochspannungsquelle miteinander verbunden sind. Durch das kurzzeitige Eintauchen der Kapillare in ein Probengefäß erfolgt die Aufnahme der Probe (1-5 nl) in die Kapillare. Dabei wird zwischen der hydrodynamischen und der elektrokinetischen Injektionstechnik als auch der Injektion durch Anlegen eines Vakuums oder dem

Siphon-Prinzip unterschieden. Die Kapillare besitzt einen unbeschichteten Bereich, der als Küvette dient und direkt mit Hilfe einer Lichtquelle durchstrahlt wird. Dabei werden die fluoreszenzmarkierten Analyte beim Passieren der Lichtquelle angeregt, das emittierte Licht wird gemessen und in einem Elektropherogramm festgehalten. Durch Zugabe eines Längenstandards, welcher in der Probe mitläuft, kann die Wanderungszeit bis zum Messfenster in die Größe der gemessenen Fragmente umgerechnet werden [Gey 2008].

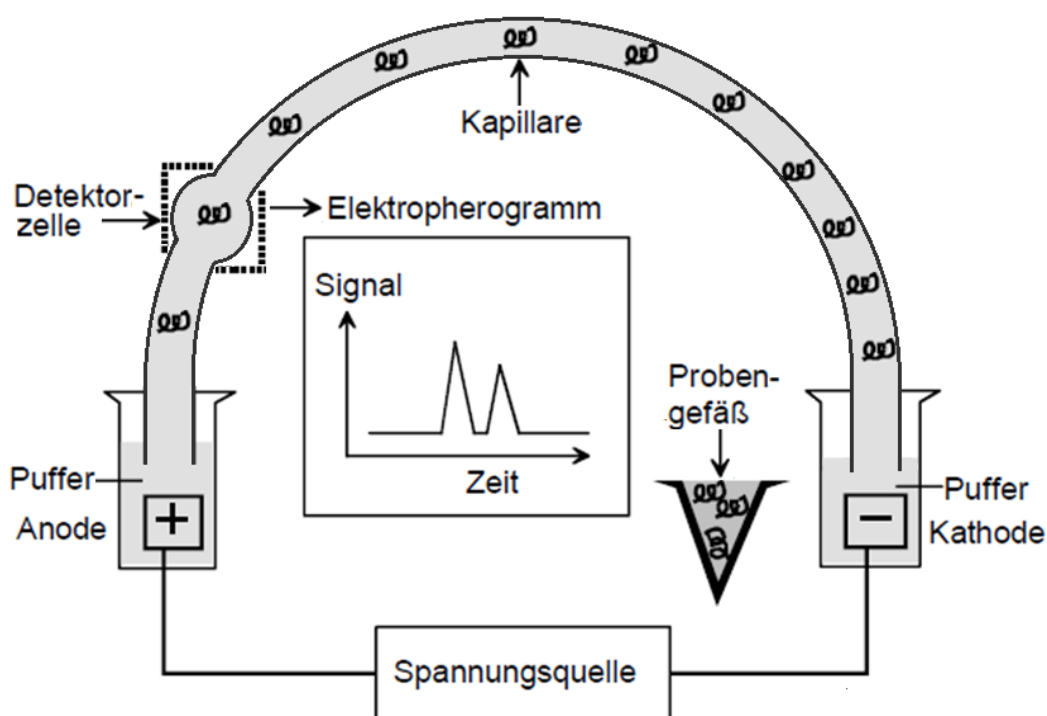


Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese [verändert nach Gey 2008].

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Optimierung eines bereits auf Funktionalität getesteten Primerdesigns. Dabei sollten zwei verschiedene Konstrukte, die auf diesem Primerdesign basieren, erstellt und miteinander verglichen werden. Zusätzlich wird ein drittes alternatives Primerdesign erstellt, auf Funktionalität geprüft und bei Funktionsfähigkeit in den Vergleich mit einbezogen. Ziel ist dabei, alle Primerdesigns zur Ausbildung von Nullallelen zu führen.

3 Material

3.1 Chemikalien

- Applied Biosystems® Hi-Di™ Formamide Lot No. 1304243
- Applied Biosystems® Buffer (10x) with EDTA Lot No. 1302418
- Applied Biosystems® 310 Genetic Analyzer Performance Optimized Polymer 4 POP-4™ Lot No. 1210196
- Applied Biosystems® POP-6™ Performance Optimized Polymer 6 Lot No. 1304226
- Applied Biosystems® Quantifiler® Human DNA Quantification Kit Lot No. 1302171
- *BigDye*® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Lot No. 1302349
- Biotype® DNA size standard 550 (ROX) Lot No. CH 1200280b
- J.T.Baker Ethanol C₂H₅OH 96%-100% 46.07g/mol Lot No. 1301009017
- Promega Water, Amplification Grade Lot No. 0000048948; 0000006090; 0000055609; 0000064534
- QIAGEN® DyeEx 2.0 Spin Kit Lot No.145020502; 145031612
- QIAGEN® Multiplex PCR Kit Lot No. 139300264
- QIAGEN® Multiplex PCR Plus Kit Lot No. 145019117, 145021493; 145029528
- QIAGEN® Buffer AE [URL-2] Lot No. 145013062
 - 10 mM Tris-HCl
 - 0.5 mM EDTA
 - pH 9.0
- MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® Tissue
 - Buffer B3 Lot No. PAF0050729
 - Buffer B5 Lot No. PAF0050508
 - Buffer T1 Lot No. PAF0050631
 - Buffer BE Lot No. PAF0050345
 - Buffer BW Lot No. PAF0050379
 - Proteinase K Lot No. P1329S
- *USB*® *Exonuclease I* (ExoI) 10 un/µl Lot No. 124511
- *USB*® *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)* 1 un/µl Lot No. 4112126

3.2 Material

- Applied Biosystems® MicroAmp™ Optical Adhesive Film PCR Compatible, DNA/RNA/RNase Free
- Applied Biosystems® MicroAmp™ Adhesive Film Applicator
- Kisker Biotech GmbH & Co.KG G310-S Septa für ABI 310, zertifiziert, RNase-, DNase frei, autoklavierbar
- Kisker Biotech GmbH & Co.KG Tubes 0,5 ml für ABI 310, zertifiziert, RNase-, DNase frei, autoklavierbar
- Kisker Biotech GmbH & Co.KG G060/H-1E Quali - PCR Platten, zertifiziert RNase-, DNase frei, 96-Well mit Halbrahmen, transparent für Applied Biosystems 3.100 Lot 110615314

3.3 Geräte und Software

- Applied Biosystems® ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer
- Applied Biosystems® ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Data Collection Version 3.1.0
- Applied Biosystems® GeneMapper™ ID Software Version 3.2 Human Identification Analysis
- Applied Biosystems® 7300 Real Time PCR System
- Applied Biosystems® Sequencing Analysis Software v5.2 Patch 2
- Applied Biosystems® Sequence Detection Software Version 1.2.3 7300 System SDS software RQ Study Application
- Heraeus Biofuge Fresco
- Hettich Zentrifugen EBA 12
- Biometra® T3 Thermocycler
- Biometra® T3000 Thermocycler
- Biometra® TGradient
- Biometra® Trio Thermoblock
- Biosan Ltd. Laboratory Medical Centrifuge LMC-3000
- Eppendorf Thermomixer® compact
- NCBI Datenbank
- The Bio-Web:

- DNA Sequence Reverse and Complement Online Tool
- DNA Protein sequence cleaner
- Sequence Manipulation Suite Version 2 (SMS2)
 - PCR Primer Stats
 - PCR Products
- Thermo SCIENTIFIC: Multiple primer analyzer
- The mfold Web Server: DNA folding form
- TOMY KOGYO CO., LTD TOMY PMC-060 Capsulefuge

4 Methoden

4.1 Primerdesign

4.1.1 Sequenzbeschaffung und Sequenzmanipulations-Tools

Die NCBI Referenz Sequenz NG_008916.1 für den autosomalen SNP A2690C wurde über die NCBI-Datenbank abgerufen. Dabei wurde die Datenbank „Nucleotide“ ausgewählt und als Suchanfrage die Referenz Sequenz eingegeben. Für einfache Sequenzmanipulationen wie die Erzeugung der komplementären Sequenz oder das Drehen der Sequenzrichtung wurde das Tool „DNA Sequence Reverse and Complement Online Tool“ von „The Bio-Web“ verwendet. Um die Sequenz von unerwünschten Zeichen zu bereinigen, fand das Tool „DNA Protein sequence cleaner“ von „The Bio-Web“ Anwendung. Zur Erzeugung der mutierten Sequenzvariante wurde an der Position 34481 das Adenin durch ein Cytosin ausgetauscht. Analog dazu wurden die Basen 34496 bis 34500 der mutierten genomischen DNA durch den Tail des mutierten Primers und die Basen 34462 bis 34468 durch den Spacer des mutierten Primers ausgetauscht. Für die Wildtyp Sequenz erfolgte der Austausch für die Basen 34498 bis 34503 durch den Tail des Wildtyp-Primers und die Basen 34462 bis 34466 durch den Spacer des Wildtyp-Primers. Für weitere Informationen siehe zusätzliches (elektronisches) Material. Die Länge der entstehenden PCR-Produkte wurde mit dem Tool „PCR Products“ von „The Bio-Web“ ermittelt.

4.1.2 Ermittlung der Schmelztemperatur

Zur Ermittlung der Schmelztemperatur wurde das Tool Primer-BLAST von NCBI verwendet. Als „PCR Template“ wurden die jeweiligen DNA-Loci-Varianten eingegeben, auf die sich die Primer-Sequenz bezieht, deren Schmelztemperatur ermittelt werden sollte. Diese Sequenz wurde unter dem Punkt „Primer Parameters“ bei „Use my own [forward/ reverse] primer“ hinterlegt. Die Parameter „PCR product size; # of primers to return und Primer melting temperatures“ wurden variiert. Unter dem Punkt „Primer Pair Specificity Checking Parameters“ wurde bei „Database - Genome

(reference assembly from selected organisms)“ und bei „Primer specificity stringency“ unter „Ignore targets that have #“ eins ausgewählt. Alle anderen Parameter wurden beibehalten und die Schmelztemperatur durch Bestätigen von „Get Primers“ ermittelt.

4.1.3 Erzeugung des Tails/Spacer

Die Tails/Spacer wurden nach folgenden Kriterien erzeugt:

- die Verlängerung erfolgte am 5'-Ende des Primers
- es wurden zur Sequenz nicht komplementäre Basen verwendet
 - bei Vorlage von Guanin bzw. Cytosin wurde Adenin bzw. Thymin verwendet und umgedreht
- falls möglich, wurden keine gleichen Basen mehrfach aneinandergereiht
- die maximale Abfolge gleicher Basen durfte die Anzahl drei nicht übersteigen
- Tail-spezifische Kriterien:
 - es wurde darauf geachtet, dass nach Möglichkeit der GC-Gehalt durch den Tail ab der zweiten PCR-Reaktion eine Verringerung aufwies
 - der mutierte Primer inklusive Tail sollte drei bis vier Basen kürzer sein als der Wildtyp-Primer inklusive Tail
 - die Schmelztemperatur der Primer-Sequenzen inklusive Tail sollten eine ähnliche Steigerung aufweisen
- Spacer-spezifische Kriterien:
 - die Länge des Spacers sollte acht Basen betragen

Nachdem die Tails/Spacer für beide Primer-Sequenzen erzeugt worden waren, wurden diese anhand der Schmelztemperatur und der Kompatibilität der Tails/Spacer sowie deren Produkte untereinander angepasst.

4.1.4 Primerdesign 1

Als Grundlage für das Primerdesign dienten Primer (siehe Tabelle 1), die für den autosomalen SNP A2690C erstellt worden waren und zuvor in der Praxis auf ihre Funktionalität überprüft wurden. Der SNP A2690C wurde ausgewählt, weil im Rahmen einer Dissertation am Institut für Rechtsmedizin Leipzig drei DNA-Loci-Varianten - homozygot AA, homozygot CC, heterozygot AC - beobachtet werden konnten [Nastainczyk-Wulf 2012].

Tabelle 1: Sequenzen und Eigenschaften der auf Funktionalität getesteten Primer auf deren Grundlage das Primerdesign 1 und 2 basiert.

Primer	Primer-Sequenz mit Markierung	Länge [bp]	Schmelz- temperatur T _m [°C]	GC-Gehalt [%]
Forward	CCGGTGGGGCAGGAGAGCAC	20	67,41	75
Reverse Wildtyp	HEX- CCTCCCCCGCCTCACCC T TG	20	66,88	75
Reverse Mutante	6-FAM- CTCCCCCGCCTCACCC C TG	19	67,14	78,95

Dabei sollte die Schmelztemperatur der Reverse-Primer durch Entfernen von ein bis maximal zwei Basen am 5'-Ende der Primer gesenkt werden. Die Schmelztemperatur der verkürzten Sequenzen wurde, wie unter dem Punkt 4.1.2 Ermittlung der Schmelztemperatur S.11 beschrieben, ermittelt. Das Paar mit der geringsten Differenz der beiden Schmelztemperaturen wurde ausgewählt.

4.1.5 Primerdesign 2

Die Basis dieses Primerdesigns bildeten die Primer aus dem Primerdesign 1. Die Sequenzdetails des Primerdesigns 1 sind dem Ergebnisteil unter 5.1 Sequenzdetails des Primerdesigns S.30 zu entnehmen. Die Tails wurden nach den Kriterien, wie unter S.12 erklärt, generiert. Die Schmelztemperatur der Gesamtsequenz (Primer und Tail) wurde, wie unter 4.1.2 Ermittlung der Schmelztemperatur S.11 beschrieben, ermittelt.

4.1.6 Primerdesign 3

Im Gegensatz zum Primerdesign 1 und 2 musste für das Primerdesign 3 die Verteilung der benachbarten SNPs des SNP A2690C auf einen möglichst großen mutationsfreien Raum für die Ankersequenz überprüft werden. Hierfür wurde die Variation ID rs1805123 des SNPs A2690C - auch synonym als K897T bezeichnet, wie in einem Paper (siehe URL-3) angegeben wurde - in das Suchfeld der NCBI-Datenbank eingetragen und als zu durchsuchende Datenbank SNP ausgewählt. Durch Anwahl des Treffers erfolgte die direkte Weiterleitung zur dbSNP-Datenbank.

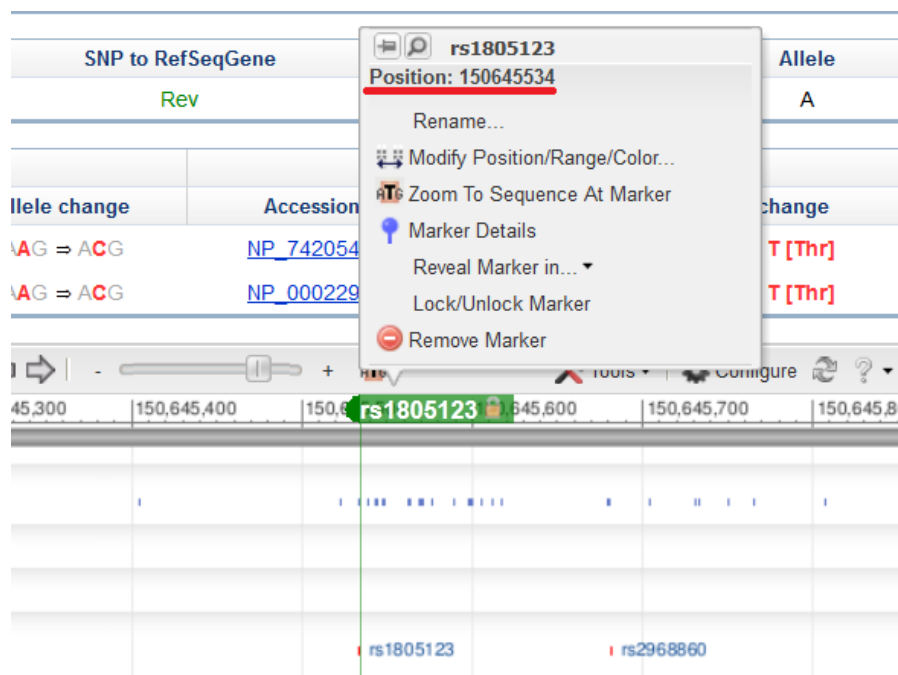


Abbildung 3: Positionsbestimmung des SNPs A2690C auf dem Chromosom.

Indem die Maus in der graphischen Darstellung direkt über die Position des SNPs geführt wurde (siehe Abbildung 3 S.14), konnte die Position 150645534 des SNPs A2690C auf dem Chromosom abgelesen werden.

Die dbSNP-Datenbank bietet eine Funktion, bei der alle SNPs in einem Bereich von -100 bis +100 Basen von der Position des SNPs angezeigt werden können. Durch die zuvor bestimmte Position auf dem Chromosomen konnten somit die benachbarten SNPs durch Anwahl von „view“ bei „Neighbor SNP“ (siehe rote Box Tabelle 2) angezeigt werden.

Tabelle 2: Auswahl der richtigen Zeile in der dbSNP mit Hilfe der zuvor bestimmten Chromosomenposition.


Integrated Maps (Hint: click on 'Chr Pos' or 'Contig Pos' column value to see variation in NCBI sequence viewer)

Assembly	Genome Build	Chr	Chr Pos	Contig	Contig Pos	SNP to Chr	Contig allele	Contig to Chr	Neighbor SNP	Map Method
GRCh37.p5	37.3	Z	150645534	NT_007914.15	11241157	Rev	T	Fwd	view	remap
reference	36.3	Z	150276467	NT_007914.14	11221550	Rev	T	Fwd	view	blast
Celera	36.3	Z	145202562	NW_923751.1	660051	Rev	T	Fwd	view	blast
HuRef	37.3	Z	148165894	NW_001839088.2	1854043	Rev	A	Rev	view	remap
HuRef	36.3	Z	144457810	NW_001839088.2	1854043	Rev	A	Rev	view	blast
CRA_TCAgchr7v2	37.3	Z	149974823	NT_079596.2	50010391	Rev	T	Fwd	view	remap
CRA_TCAgchr7v2	36.3	Z	149974823	NT_079596.2	50010391	Rev	T	Fwd	view	blast

Da das zu amplifizierende Fragment auf einen Größenbereich von 100 bis 250 Basen festgelegt wurde, musste der Sequenzbereich um die Position des SNPs „Up- und/oder Downstream“ nach einem Bereich abgesucht werden, der keine SNPs enthält und lang genug für einen Primer - also mindestens 18 bis 30 Basen lang - und einer Ankersequenz ist. Die Sequenzlänge der Ankersequenz wurde dabei durch die Schmelztemperatur, die oberhalb von 75°C liegen sollte, festgelegt.

Tabelle 3: Darstellung der Nachbar-SNPs 100 Basen „Up- und Downstream“ des SNPs A2690C. Dieser SNP wurde auf Null gesetzt.

Neighbor (within 100 bases) SNP for rs1805123:

distance (base)	rs	map weight	validation	assembly	Contig accession	Contig position
-10	rs200032281	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241147
0	rs1805123	1		GRCh37.p5	NT_007914.15	11241157
6	rs199473434	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241163
9	rs199473668	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241166
10	rs199473433	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241167
15	rs146730304	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241172
16	rs201627778	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241173
30	rs199473432	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241187
31	rs140279503	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241188
36	rs202194495	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241193
37	rs143512106	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241194
43	rs201765446	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241200
55	rs199473040	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241212
65	rs147980211	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241222
66	rs140743924	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241223
73	rs41314354	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241230
79	rs150089655	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241236
83	rs199828796	1	N.D.	GRCh37.p5	NT_007914.15	11241240

Aufgrund der Tatsache, dass Upstream keine größeren mutationsfreien Räume vorliegen, wie in Tabelle 3 zu erkennen ist, wurde die Orientierung der Primer geändert (siehe Abbildung 4). Die Sequenzlänge des DNA-Loci-spezifischen Primer-Teils sollte dabei in einem Bereich von 15 bis 17 bp liegen.

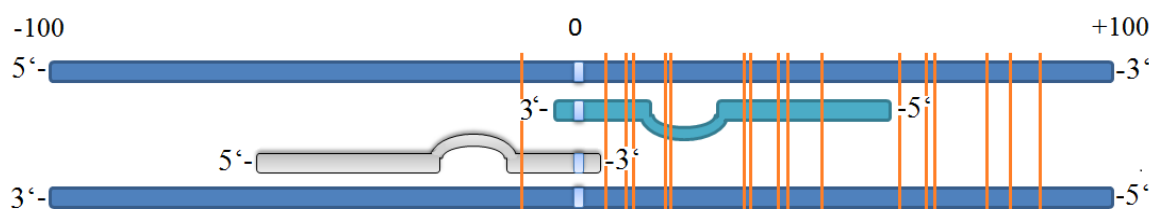


Abbildung 4: Richtungswechsel der Orientierung der Primer des Primerdesign 3.

Die Manipulation der Sequenz im Bereich des neuen Primer-Intervalls erfolgte wie unter 4.1.1 Sequenzbeschaffung und Sequenzmanipulations-Tools S.11 beschrieben. Für die möglichen Primer-Sequenzen wurden die Schmelztemperaturen, wie unter 4.1.2 Ermittlung der Schmelztemperatur S.11 aufgeführt, ermittelt. Das Primer-Paar, dessen Schmelztemperatur annähernd bei 60°C lag und deren Temperaturdifferenz zueinander am geringsten war, wurde ausgewählt. Der Spacer wurde nach den Kriterien erzeugt, die unter 4.1.3 Erzeugung des Tails/Spacer S.12 beschrieben sind. Die Ankersequenz sollte fünf Basen „Downstream“ des 5'-Ende beginnen. Da sich die Primer in ihrer Länge um zwei Basen unterschieden, ergaben sich zwei Ankersequenzintervalle (siehe Abbildung 5).

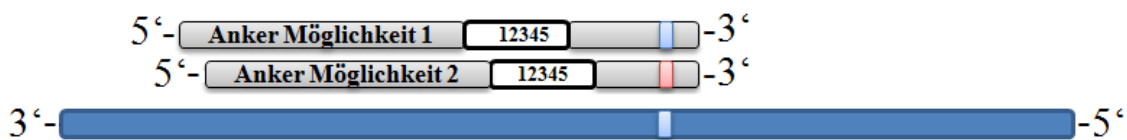


Abbildung 5: Zwei verschiedene mögliche Intervalle für die Ankersequenz des Primerdesign 3.

Die ermittelten Sequenzen wurden von 25 bp bis 35 bp verlängert und jeweils die Schmelztemperatur dieser Sequenzen, wie unter 4.1.2 Ermittlung der Schmelztemperatur S.11 beschrieben, ermittelt. Ankersequenzen mit einer Schmelztemperatur oberhalb von 75°C wurden mithilfe des Tools „PCR Primer Stats“ von „The Bio-Web“ auf „Hairpin“-Strukturen und „Self-Annealing“ untersucht. Ankersequenzen, die in beiden Fällen keine Strukturen bildeten, wurden im Anschluss auf die Erzeugung von unerwünschten Produkten mit den Forward-Primern mittels des Tools „Multiple primer analyzer“ von Thermo Scientific getestet. Der Reverse-Primer wurde mit dem Tool Primer-Blast von NCBI gesucht, wobei das zu amplifizierende Produkt auf 100 bp bis 250 bp beschränkt wurde. Reverse-Primer, deren Schmelztemperatur oberhalb von 69°C lagen, wurden analog, wie eben bei der Ankersequenz beschrieben, auf „Hairpin“- und „Self-Annealing“ untersucht. Bei Nicht-Ausbilden von Strukturen erfolgte der Abgleich auf unerwünschte Produkte mit den Forward-Primern und den möglichen Ankersequenzen mit dem „Multiple primer analyzer“. Reverse-Primer, die keine unerwünschten Produkte erzeugten, wurden verlängert, bis deren Schmelztemperatur oberhalb von 75°C lag, wobei die kürzeste Variante gewählt wurde. Abschließend erfolgte für die möglichen Primer-Konstrukte

die Überprüfung über die gesamte Sequenzlänge (Anker, Spacer und Primer) mit Hilfe des Tools „DNA folding form“ von The mfold Web Server auf Sekundärstrukturen. Das Primer-Konstrukt, welches die geringsten Sekundärstrukturen ausbildete und deren Stabilität außerhalb der belegten Temperaturen lag, wurde verwendet und ist im Ergebnisteil unter dem Punkt 5.1 Sequenzdetails des Primerdesigns S.30 aufgeführt.

4.2 DNA-Isolierung nach Macherey-Nagel

Von einer asservierten Trockenblut-Probe wurde ein 5 x 5 mm-Quadrat in ein Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden 220 µl T1-Puffer und 25 µl Proteinase K hinzugefügt und 60 Minuten bei 1250 rpm und 56°C inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden nach jedem Schritt gemischt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde nach jeder Inkubation Kondenswasser, welches sich am Deckel befand, durch kurzes Zentrifugieren entfernt. Anschließend wurden 200 µl B3-Puffer hinzupipettiert und zehn Minuten bei 1250 rpm und 70°C inkubiert. Nach der Zugabe von 210 µl Ethanol wurde der gesamte Inhalt des Reaktionsgefäßes auf eine Waschsäule gegeben und bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Säulenmembran wurde auf ein neues Abfallgefäß überführt, wobei 500 µl BW-Puffer hinzugegeben wurden. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation für eine Minute bei 8000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, und die Membran wurde auf ein neues Abfallröhrchen überführt. Nach Hinzugeben des Puffers B5 folgte eine Zentrifugation für drei Minuten bei 13000 rpm. Die Säulenmembran wurde im Anschluss auf ein neues Reaktionsgefäß überführt, und 200 µl BE-Puffer wurden hinzugefügt. Es erfolgte eine letzte Inkubation für fünf Minuten bei 70°C, an die sich eine Zentrifugation für eine Minute bei 8000 rpm anschloss. Die Säulenmembran wurde verworfen, und die isolierte DNA bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

4.3 Polymerase Kettenreaktion

4.3.1 DNA-Quantifizierung mittels Real-Time PCR

Zu Beginn der DNA-Konzentrationsbestimmung wurde eine Standardreihe angelegt. Dazu wurden acht Reaktionsgefäße aufgestellt. In das erste Röhrchen wurden 30 µl und in die restlichen jeweils 20 µl AE Puffer vorgelegt. Danach wurden 10 µl Standardkonzentrat in das erste Röhrchen pipettiert. Nach dem Mischen wurden aus dem ersten Reaktionsgefäß 10 µl entnommen und in das zweite Reaktionsgefäß überführt. Aus dem zweiten Reaktionsgefäß wurden wiederum 10 µl nach dem Mischen entnommen und in das dritte Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde bis zum achten Reaktionsgefäß ausgeführt. Für die zu quantifizierenden Proben wurde ein Mastermix nach folgendem Schema hergestellt: (9,35 µl Reaktionsmix + 7,85 µl Primer-Mix) * (Anzahl der Proben + 8 Standards + 3 Reserve). Da der Reaktionsmix sehr leicht aufschäumt, muss dieser zuvor vorsichtig geschwenkt werden, um eine homogene Durchmischung zu gewährleisten. Von diesem Mastermix wurden in jede Reaktionskammer 17 µl + 1,5 µl Probe bzw. Standard bzw. Positiv- oder Negativkontrolle pipettiert. Anschließend wurde eine durchsichtige Folie auf die PCR-Platte luftblasenfrei mit dem MicroAmp™ Adhesive Film Applicator appliziert. Darauf folgend wurde die PCR-Platte in der Plattenzentrifuge für eine Minute bei 2000 rpm zentrifugiert. Das in der Software angegebene Reaktionsvolumen wurde von 25 µl auf 18 µl heruntergesetzt. Das PCR-Protokoll für die Quantifizierung mittels der Real Time PCR ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind im Anhang unter 1 DNA-Quantifizierung S. 62 einzusehen.

Tabelle 4: PCR-Protokoll für die DNA-Quantifizierung mittels Real-Time PCR.

<u>PCR-Protokoll DNA-Quantifizierung</u>			
Initiale Denaturierung		10 min	95°C
40 * 2-Schritt-Zyklus			
Denaturierung		15 s	95°C
Annealing/ Elongation		60 s	60°C

4.3.2 Allel-spezifische PCR

Der Ausgangspunkt für die PCR orientierte sich an den Parametern der auf Funktionalität getesteten Primern. Die eingesetzte DNA-Menge lag bei 2 ng, die Primer-Konzentration bei annähernd 0,04 μM und die Annealing-Temperatur, bei der ein Primer-Ausfall auftrat, bei 69°C. Die PCR-Zyklenzahl wurde zunächst auf 35 Zyklen festgesetzt [Mergner 2013]. Die Proben wurden nach dem Schema in Tabelle 5 pipettiert. Dabei wurde ein Mastermix aus der Q-Solution und dem Reaktionsmix nach folgender Vorschrift hergestellt: $((\text{Anzahl Reaktionen} + \text{Reserve-Reaktion}) \cdot 12,5 \mu\text{l Reaktionsmix}) + ((\text{Anzahl Reaktionen} + \text{Reserve-Reaktion}) \cdot 2,5 \mu\text{l Q-Solution})$. Die Anzahl der Reserve-Reaktionen richtete sich dabei nach der Anzahl der Reaktionen, d.h. bis zehn Reaktionen wurde eine Reserve-Reaktion ab 20 zwei et cetera eingeplant.

Alle Pipettierschemata sowie die PCR-Protokolle können bei Bedarf im zusätzlichen (elektronischen) Material eingesehen werden.

Tabelle 5: Pipettierschema für die Allel-spezifische PCR. Variierende Parameter wurden mit dem Begriff *Variabel* versehen.

Komponenten	Volumen/Reaktion
Master Mix (Reaktionsmix (2x Multiplex PCR Master Mix) + Q-Solution, 5x	15 μl
RNase-free water	Variabel in μl
Template-DNA	2 ng (Variabel)
Primer-Mix 20x	1,25 μl
Konzentration der Primer in der Reaktion (cPM)	0,04 μM (Variabel)
Endvolumen	25 μl

Aus den gelieferten Primern wurde je eine 50 μM Stammlösung nach Herstellerangaben hergestellt. In Tabelle 6 S.21 ist das PCR-Programm aufgeführt, welches von Qiagen empfohlen wird. Die Parameter, die regelmäßig verändert wurden, sind durch den Begriff „Variabel“ gekennzeichnet.

Tabelle 6: Das empfohlene PCR-Programm von Qiagen, welches für die Allel-spezifische PCR Anwendung fand.

PCR-Protokoll asPCR		
Initiale Denaturierung	5 min	95°C
Variabel * 3-Schritt-Zyklus		
	Denaturierung	30 s 95°C
	Annealing	90 s Variabel
	Elongation	30 s 72°C
Finale Elongation	30 min	68°C
Pause	—	4°C

In Tabelle 7, Tabelle 8 und Tabelle 9 S.21 - 25 wurden alle in der PCR veränderten Parameter zusammengefasst. Die Tabellen wurden nach dem Primerdesign sortiert. Die Bezeichnung cPM steht für Primer-Konzentration in der Reaktion.

Tabelle 7: Zusammenfassung der veränderten PCR-Parameter für das Primerdesign 1. ZA steht für Zyklenanzahl und AT für Annealing-Temperatur.

PCR Nr.	Parameter				Bemerkung
	ZA	AT [°C]	cPM [µM]	DNA [ng]	
1	35x	63	0,04	2	<u>Primer-Auftrennung:</u> - Forward-Primer (for) und Reverse-Primer A (revA) - for und Reverse-Primer C (revC)
2		66			
3		69			
4	30x	63			
5		64			
6		65			
7		66			<u>Primer-Mix:</u> - for + revA + revC

PCR Nr.	Parameter				Bemerkung	
	ZA	AT [°C]	cPM [μM]	DNA [ng]		
9	30x	66	0,04	2; 1; 0,5; 0,25; 0,125	Verwendung verschiedener DNA-Konzentrationen und dreifache Durchführung der Reaktion unter Verwendung der DNA-Loci-Variante AC	
11	30x	66	<u>for + revC:</u> 0,04 <u>revA:</u> 0,04; 0,045; 0,05	1	Verwendung verschiedener revA-Konzentrationen und dreifache Durchführung der Reaktion unter Verwendung der DNA-Loci-Variante AC	
13					zehnfache Durchführung der Reaktion für die DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC	
17		67			zehnfache Durchführung der Reaktion für die DNA-Loci-Variante CC	
18		68			<u>for + revC:</u> 0,04	zehnfache Durchführung der Reaktion für die DNA-Loci-Variante CC
22		67			<u>revA:</u> 0,045	zehnfache Durchführung der Reaktion für die DNA-Loci-Varianten AA und AC

Tabelle 8: Zusammenfassung der veränderten PCR-Parameter für das Primerdesign 2.

PCR Nr.	Parameter				Bemerkung
	ZA	AT [°C]	cPM [μM]	DNA [ng]	
1	35x	63	0,04	2	<u>Primer-Auftrennung:</u> - Forward-Primer (for) und Reverse-Primer A (revA_tail)
2		66			
3		69			
4	30x	63			

PCR Nr.	Parameter				Bemerkung
	ZA	AT [°C]	cPM [μM]	DNA [ng]	
5	30x	64	0,04	2	- for und Reverse- Primer C (revC_tail) DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC
6		65			
8		66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 30			
10	30x	66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 30			<u>Primer-Mix:</u> - for + revA_tail + revC_tail DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC → 1 μl des PCR-Produktes in die Kapillarelektrophorese eingebracht
12	32x	66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 32			Verwendung verschiedener revC_tail-Konzentrationen und dreifache Durchführung der Reaktion unter Verwendung der DNA-Loci- Variante AC → 1 μl des PCR-Produktes in die Kapillarelektrophorese eingebracht
14	32x	66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 32	<u>for +</u> <u>revA tail:</u> 0,04 <u>revC tail:</u>		Wiederholung: Verwendung verschiedener revC_tail- Konzentrationen unter Verwendung der DNA-Loci- Variante AC → 1 μl des PCR-Produktes in die Kapillarelektrophorese eingebracht
15	30x	66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 30	0,03; 0,035; 0,04		
16	32x	66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 32			

PCR Nr.	Parameter				Bemerkung
	ZA	AT [°C]	cPM [μM]	DNA [ng]	
23	30x	66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 30	<u>for +</u> <u>revA_tail:</u> 0,04 <u>revC_tail:</u> 0,035	2	zehnfache Durchführung der Reaktion für die DNA-Loci- Varianten AA, AC und CC → 1 μl des PCR-Produktes in die Kapillarelektrophorese eingebracht
26		66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 30	<u>for +</u> <u>revA_tail:</u> 0,04 <u>revC_tail:</u> 0,035		zehnfache Durchführung der Reaktion für die DNA-Loci- Variante AC → 1 μl des PCR-Produktes in die Kapillarelektrophorese eingebracht
30		66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 30	<u>for +</u> <u>revA_tail:</u> 0,04 <u>revC_tail:</u> 0,035		zehnfache Durchführung der Reaktion für die DNA-Loci- Varianten AA und CC → 1 μl des PCR-Produktes in die Kapillarelektrophorese eingebracht
35		66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 30		2; 1; 0,5; 0,25; 0,125	Verwendung verschiedener DNA-Konzentrationen und dreifache Durchführung der Reaktion unter Verwendung der DNA-Loci-Variante AC → 1 μl des PCR-Produktes in die Kapillarelektrophorese eingebracht
40	32x	66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 30			

Tabelle 9: Zusammenfassung der veränderten PCR-Parameter für das Primerdesign 3.

PCR Nr.	Parameter				Bemerkung
	ZA	AT [°C]	cPM [µM]	DNA [ng]	
19	35x	60	0,04	2	<u>Primer-Auftrennung:</u> - Forward-Primer A (forA) und Reverse-Primer (rev) - Forward-Primer C (forC) und rev
20		63			
21		66			
24	30x	69 → Zyklus 1 - 5 72 → Zyklus 6 - 30			
25		66 → Zyklus 1 - 5 69 → Zyklus 6 - 30			<u>Primer-Auftrennung:</u> - forA + rev DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC → 1 µl des PCR-Produktes in die Kapillarelektrophorese eingebracht
27	35x	66			<u>Primer-Auftrennung:</u> - forA + rev - forC + rev DNA-Loci-Varianten AA und CC → 1 µl des PCR-Produktes in die Kapillarelektrophorese eingebracht
28		67			
29		68			
31		69			
32		70			
33		71			
34		72			
36		69			Wiederholung: <u>Primer-Auftrennung:</u> - forC + rev
37		70			

PCR Nr.	Parameter				Bemerkung
	ZA	AT [°C]	cPM [μM]	DNA [ng]	
38	35x	71	0,04	2	DNA-Loci-Variante AA → 1 μl des PCR-Produktes in die Kapillarelektro- phorese eingebracht
39		72			

4.3.3 Sequenzierung nach Sanger

Vorbereitend für die Sequenzierungsreaktion, wurde eine PCR angesetzt, bei der zunächst das Template vervielfältigt wurde. Dabei wurden die Komponenten, wie sie in Tabelle 10 aufgelistet sind, in ein Reaktionsgefäß pipettiert und das Template nach den Vorgaben im PCR-Protokoll Tabelle 11 S.27 vervielfältigt.

Tabelle 10: Pipettierschema zur Vervielfältigung der Templates für die Sequenzierungs-PCR.

Primer-Konstellation for + rev				
Komponenten/Bezeichnung	AA	AC	CC	Negativ-Kontrolle
Reaktionsmix MM 2x	6,25 μl	6,25 μl	6,25 μl	6,25 μl
Primer for (50 μM Stammlösung)	0,4 μl	0,4 μl	0,4 μl	0,4 μl
Primer rev (50 μM Stammlösung)	0,4 μl	0,4 μl	0,4 μl	0,4 μl
RNase freies Wasser	4,54 μl	3,64 μl	2,21 μl	5,95 μl
Template DNA (21 ng)	1,41 μl	2,31 μl	3,74 μl	-
Endvolumen	13 μl	13 μl	13 μl	13 μl
Konzentration der Primer in der Reaktion (cPM)	1,54 μM			

Tabelle 11: PCR-Protokoll zur Erzeugung und Vervielfältigung des zu sequenzierenden DNA-Fragmentes.

PCR-Protokoll Template-Erzeugung		
Initiale Denaturierung	15 min	95°C
30 * 3-Schritt-Zyklus		
	Denaturierung	30 s 94°C
	Annealing	50 s 64°C
	Elongation	40 s 72°C
Finale Elongation	20 min	60°C
Pause	—	8°C

Im Anschluss an diese PCR wurden 0,4 µl ExoI (*Exonuclease I*) und 1 µl SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) zu jedem Reaktionsgefäß pipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Enzyme wurden im Anschluss für 15 Minuten bei 75°C inaktiviert.

Für die Sequenzierungsreaktion wurden die Komponenten, wie unter Tabelle 12 angegeben, in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die Sequenzierungsreaktion lief unter den Bedingungen, wie sie in Tabelle 13 S.28 dargestellt sind, ab.

Tabelle 12: Pipettierschema für die Sequenzierungsreaktion.

Reagenz	AA	AC	CC	Negativ-Kontrolle	Kontroll-DNA
Ready Reaction Premix	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
BigDye Sequencing Buffer	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Template (PCR-Produkt)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Wasser	11 µl	11 µl	11 µl	11 µl	11 µl
Primer	1 µl (1:5)	1 µl (1:5)	1 µl (1:5)	1 µl (1:5)	1 µl
Verwendete Primer	for (50 µM Stammlösung)				Kit

Reagenz	AA	AC	CC	Negativ-Kontrolle	Kontroll-DNA
Konzentration der Primer in der Reaktion (cPM)	0,5 µM	0,5 µM	0,5 µM	0,5 µM	Kit (Konzentration unbekannt)
Endvolumen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Tabelle 13: PCR-Protokoll für die Sequenzierungsreaktion.

PCR-Protokoll Sequenzierung			
Initiale Denaturierung		1 min	96°C
30 * 3-Schritt-Zyklus			
	Denaturierung	10 s	96°C
	Annealing	5 s	50°C
	Elongation	4 min	60°C
Pause		—	4°C

Im Anschluss an die Sequenzierungsreaktion erfolgte eine weitere Aufreinigung mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit von Qiagen. Zur Vorbereitung der Reinigungssäule wurde diese vorsichtig durchmischt. Anschließend wurde die Schutzkappe entfernt, die Säule auf ein Abfallgefäß überführt, und der Deckel leicht aufgedreht. Nach der folgenden Zentrifugation für drei Minuten bei 3000 rpm wurde der Überstand verworfen und die Reinigungssäule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der gesamte Inhalt des PCR-Reaktionsgefäßes aus der Sequenzierung wurde auf die Mitte des Gels der Reinigungssäule pipettiert. Abschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation für drei Minuten bei 3000 rpm. Die Säule wurde verworfen und die Probe bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

4.4 Kapillargelelektrophorese

4.4.1 Allel-spezifische PCR

Für die Kapillargelelektrophorese wurde ein Mastermix nach folgender Vorschrift erstellt: $((\text{Anzahl der Proben} + 3 \text{ Reserve}) * 12 \mu\text{l Formamide}) + ((\text{Anzahl der Proben} + 3 \text{ Reserve}) * 0,025 \mu\text{l DNA-Standard ROX 550})$. Von diesem Mastermix wurden je $12 \mu\text{l}$ und $0,5 \mu\text{l}$ des PCR-Produkts in die Reaktionsgefäße für die Kapillargelelektrophorese pipettiert. Nach dem anschließenden Mischen wurden die Proben bei 95°C für drei Minuten denaturiert, bevor diese ins Gerät überführt wurden. Abweichungen von diesem Schema wurden in den Tabellen 7 bis 9 (siehe S. 21 - 25) angegeben. Von den im Programm „Applied Biosystems® ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Data Collection Version 3.1.0“ voreingestellten Parametern wurde die Laufzeit von 25 Minuten auf 20 Minuten heruntersetzt und als Matrix Biotype-D (07.02.07) ausgewählt. Zur Auswertung der Daten wurde im Programm „Applied Biosystems® GeneMapper™ ID Software Version 3.2 Human Identification Analysis“ bei „Analysis Method“ „Microsatellite Default“ und bei „Size Standard“ „550ROX-475“ eingestellt.

4.4.2 Sequenzierung nach Sanger

Für die Kapillarelektrophorese wurden jeweils $10 \mu\text{l}$ Formamide und $10 \mu\text{l}$ PCR-Produkt aus der Sequenzierungsreaktion in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben für zwei Minuten bei 90°C denaturiert. Im Programm „Applied Biosystems® ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Data Collection Version 3.1.0“ wurde im „Sample Sheet“ bei „DyeSet/ Primer“ „KB_310_POP6_BDTv3_36 Rapid.mob“ ausgewählt. Des Weiteren wurde von den voreingestellten Parametern die Laufzeit von 36 Minuten auf 26 Minuten heruntersetzt. Zur Auswertung der Daten wurde im Programm „Applied Biosystems® Sequencing Analysis Software v5.2 Patch 2“ bei „BaseCaller“ „Basecaller-310POP6.bcp“, bei „DyeSet/ Primer“ „DT310POP6 (BDv3)v2.mob“ und bei „Matrix File“ „BigDye3.1_Seq_POP6_Rapid_190713“ eingestellt. Die von der Software gewählten Start- und Stopppunkte wurden teilweise variiert.

5 Ergebnisse

5.1 Sequenzdetails des Primerdesigns

In Tabelle 14 sind die ausgewählten Sequenzen der Primerdesigns zusammengefasst. Weiterhin sind deren Länge, Schmelztemperatur, GC-Gehalt, Bezeichnung und Farbmarkierung aufgeführt.

Tabelle 14: Sequenzdetails und Eigenschaften der Primer für alle drei Primerdesigns. PD steht für Primerdesign. Die Schmelztemperatur (T_m) und der GC-Gehalt wurde mit dem Tool Primer-Blast von NCBI bestimmt. Grün markierte Buchstaben stehen für die Wildtyp Base und rot markierte Buchstaben stehen für die mutierte Base und heben die Position des SNPs A2690C in der Sequenz hervor. Kleine Buchstaben stehen für nicht mit der genomischen DNA komplementäre Sequenzen (Tails und Spacer).

PD	Primer-Name	Primer-Sequenz 5'→3'	Länge [bp]	T _m [°C]	GC [%]	Farbe
1; 2	for	CCGGTGGGGCAGGAGAG CAC	20	67,41	75,00	-
1	revA	CTCCCCGCCTCACCCCT G	19	64,60	73,68	HEX
1	revC	CCCCGCCTCACCCCTG	17	65,04	82,35	6-FAM
2	revA_tail	tagttaCTCCCCGCCTCAC CCTTG	25	67,36	60,00	HEX
2	revC_tail	cataaCCCCGCCTCACCC GTG	22	67,39	68,18	6-FAM
3	forA	GTGGCTTCAGTCGGCAA CGCAAGCGCAAGTTGTC CcatactatCAGGCGCACGG ACAAGG	60	-	-	HEX
3	forC	GTGGCTTCAGTCGGCAA CGCAAGCGCAAGTTGTC CtatattagGGCGCACGGACA CGG	58	-	-	6-FAM

PD	Primer-Name	Primer-Sequenz 5'→3'	Länge [bp]	T _m [°C]	GC [%]	Farbe
3	rev	ACTGGAGGAAGGGATGG GAAGGTCTGAGGCCTGG	34	75,16	61,76	-

Dabei konnte die Schmelztemperatur für die Primer forA und forC (siehe Tabelle 14 S.30) nicht mit der hier verwendeten Software Primer-Blast bestimmt werden. Primer-Blast beschränkt dabei die Eingabe auf Sequenzen mit einer maximalen Länge von 50 Basen.

In Tabelle 15 sind die theoretisch entstehenden PCR-Produktgrößen der verwendeten Primer-Kombinationen zusammengefasst.

Tabelle 15: Ermittelte theoretische Produktlänge, die durch die Primer der drei verschiedenen Primerdesigns erzeugt wurden.

Theoretisch zu erwartendes PCR-Produkt		
Primerdesign	Primer-Kombination	PCR-Produktlänge [bp]
1	for + revA	166
1	for + revC	164
2	for + revA_tail	172
2	for + revC_tail	169
3	forA + rev	180
3	forC + rev	178

Da sich das Primerdesign der Allel-spezifischen Primer auf die Sequenz um den SNP beschränkte, mussten in einigen Punkten Kompromisse zu den allgemeinen Empfehlungen für ein gutes Primerdesign eingegangen werden. Kompromisse wurden dabei vor allem beim GC-Gehalt, der maximalen Abfolge von drei gleichen Basen und den empfohlenen zwei bis drei C/Gs am 3'-Ende eingegangen.

5.2 Primerdesign 1

5.2.1 Bestimmung der Annealing-Temperatur bei aufgetrennten Primern

Um die Annealing-Temperatur - bei dem der Primer-Ausfall zustande kommt - festzustellen, wurden drei PCRs bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen - 63°C,

66°C und 69°C - durchgeführt. Die Reverse-Primer wurden dabei zunächst mit einem gemeinsamen Forward-Primer in zwei verschiedene Reaktionsgefäße in den Kombinationen for + revA und for + revC bei einer Konzentration von 0,04 µM eingebracht. Es wurden jeweils 2 ng DNA der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC in die Reaktion eingebracht. Die Amplifikate wurden innerhalb von 35 Zyklen amplifiziert. Dabei konnte bei der Primer-Kombination for + revC in Verbindung mit der DNA-Loci-Variante AA bei allen drei Temperaturen kein Signal ermittelt werden. Bei der DNA-Loci-Variante AC wurde durch beide Primer-Kombinationen jeweils nur das gewünschte Signal ermittelt, welches durch den jeweiligen Primer zu erwarten war. Die Länge des Fragments, welches durch die Primer-Kombination for + revA erzeugt wurde, beträgt dabei rund 163 bp. Annähernd 161 bp wurden für die Primer-Kombination for + revC ermittelt. Unter Verwendung der DNA-Loci-Variante AA in Verbindung mit der Primer-Kombination for + revA und der Primer-Kombination for + revC in Verbindung mit der DNA-Loci-Variante CC konnte nur das gewünschte Signal verzeichnet werden. Für die DNA-Loci-Variante CC in Verbindung mit der Primer-Kombination for + revA konnte - wie in Abbildung 6 dargestellt - bei 66°C nur noch ein sehr geringes falsches Signal von 124 rfu im grünen Farbkanal verzeichnet werden.

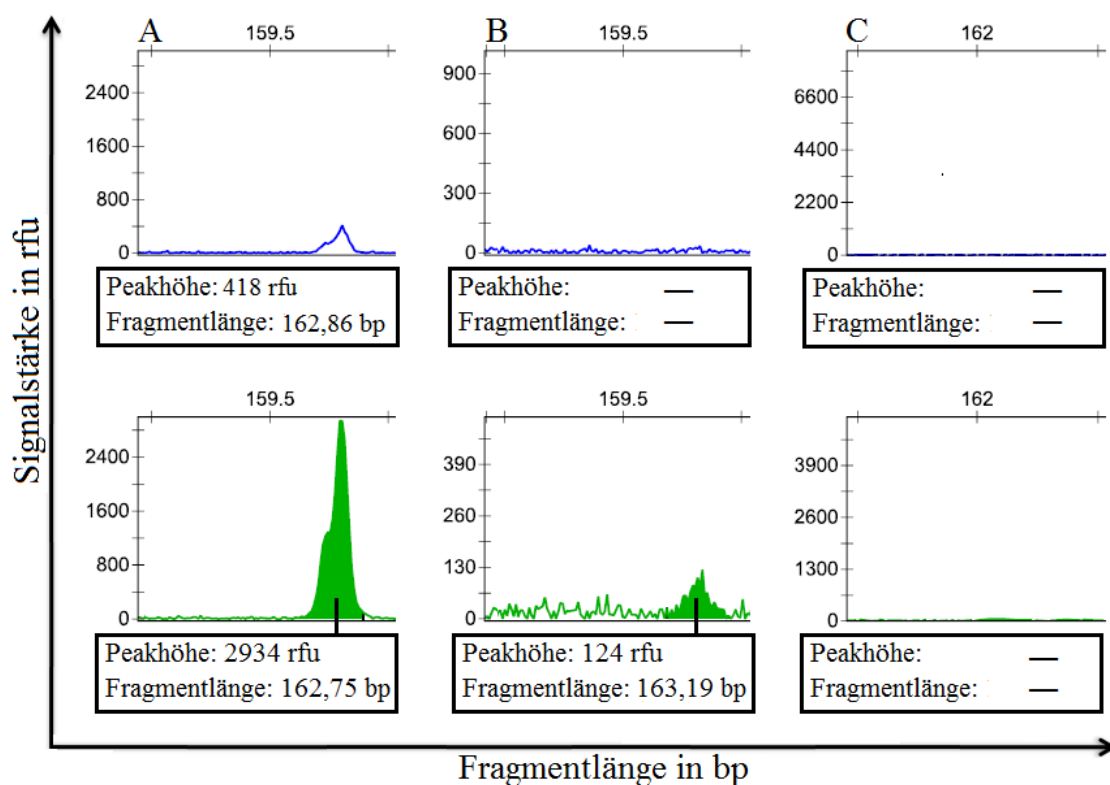


Abbildung 6: PD1 - Signalstärke der DNA-Loci-Variante CC in Abhängigkeit der Annealing-Temperatur (AT 63°C, 66°C und 69°C). In die PCR wurden 2 ng DNA der DNA-Loci-Variante

homozygot CC eingebracht und die Fragmente innerhalb von 35 Zyklen amplifiziert. Für die Amplifizierung wurde die Primer-Kombination: Forward-Primer (for) und die Wildtypvariante Reverse-Primer A (revA) mit Konzentrationen von jeweils 0,04 μM verwendet. A) 63°C; B) 66°C; C) 69°C. Signale im grünen und blauen Farbkanal, welche annähernd dieselben Größen aufweisen, sind als Durchschläge zu verstehen.

Aus diesem Grund wurde diese Temperatur für die weiteren Versuche mit einer verringerten Zyklenzahl festgesetzt. Alle Elektropherogramme sind bei Bedarf im elektronisch mitgelieferten Ordner „Zusätzliches Material“ einzusehen.

5.2.2 Nachweis des Ausfalls unter Verwendung des Primer-Mix

Die zuvor festgelegte Annealing-Temperatur wurde in einer weiteren Reaktion mit der Primer-Kombination for + revA + revC und einer Primer-Konzentration von 0,04 μM bei 30 Zyklen erneut durchgeführt. Dabei konnte - wie in Abbildung 7 dargestellt - der Ausfall unter Verwendung von 2 ng DNA der jeweiligen DNA-Loci-Variante nachgewiesen werden.

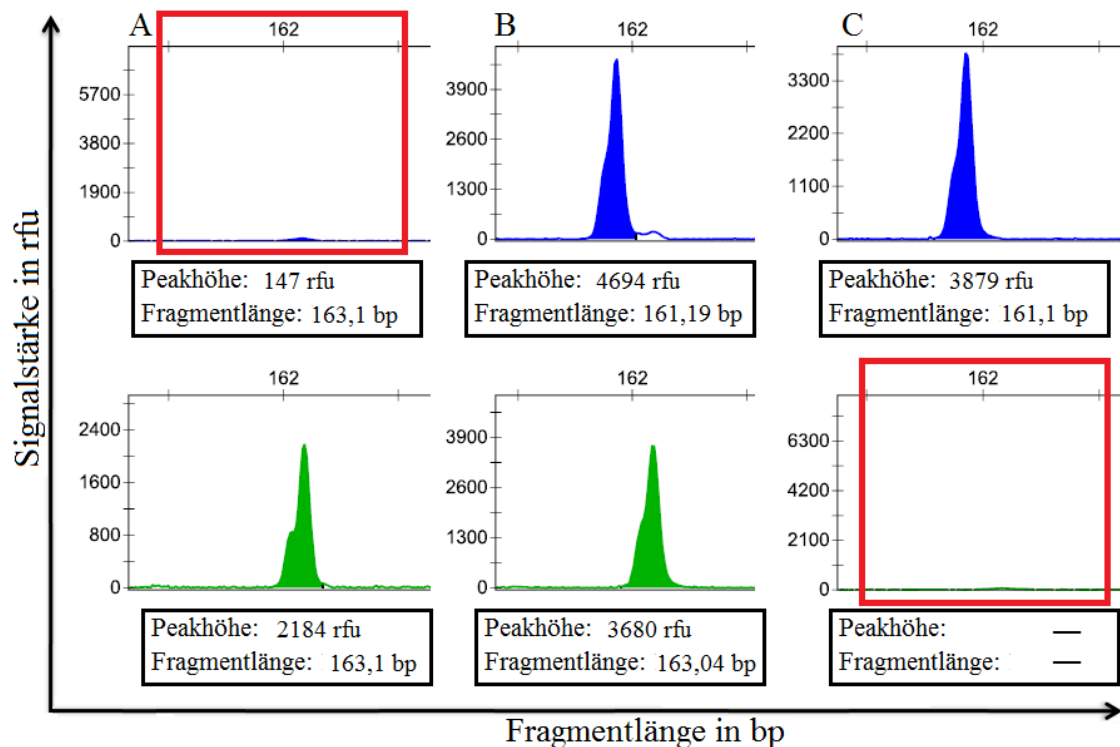


Abbildung 7: PD1 - Nachweis des Primer-Ausfalls bei einer Annealing-Temperatur von 66°C unter Verwendung des Primer-Mixes (for + revA + revC) in Verbindung mit den DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC. In die Reaktion wurden 2 ng DNA eingebracht und die Amplifikate innerhalb von

30 Zyklen bei einer Primer-Konzentration von 0,04 μ M amplifiziert. A) DNA-Loci-Variante AA; B) DNA-Loci-Variante AC; C) DNA-Loci-Variante CC. Signale im grünen und blauen Farbkanal, welche annähernd dieselben Größen aufweisen, sind als Durchschläge zu verstehen.

Dabei ist in Abbildung 7 S.33 sehr gut zu erkennen, dass unter den gewählten Bedingungen bei der DNA-Loci-Variante AA nur ein gewünschtes grünes Signal durch den Primer revA und bei der DNA-Loci-Variante CC ein gewünschtes blaues Signal durch den Primer revC erzeugt wurde. Die ermittelten Signale bei der DNA-Loci-Variante AC zeigen dabei zunächst einen guten Ausgleich bei einer Primer-Konzentration von 0,04 μ M.

5.2.3 Verschiedene DNA-Konzentrationen in Verbindung mit der DNA-Loci-Variante AC

Für die DNA-Loci-Variante AC wurden jeweils drei gleiche Reaktionen bei Verwendung unterschiedlicher DNA-Mengen (2 ng; 1 ng; 0,5 ng; 0,25 ng; 0,125 ng) durchgeführt. Die Reaktion lief bei einer Annealing-Temperatur von 66°C und 30 Zyklen ab. Die Primer-Konzentration aller drei Primer betrug 0,04 μ M. Im Diagramm 1 S.35 ist dabei die durchschnittlich ermittelte Signalstärke in Abhängigkeit der DNA-Konzentration dargestellt. Der Anteil des grünen zum blauen Signal beträgt bei 2 ng DNA 82,5%, bei 1 ng 72,3%, bei 0,5 ng 66,9% und bei 0,25 ng 83,1%. Bei einer DNA-Konzentration von 0,125 ng übersteigt der Anteil des grünen Signals das blaue Signal mit 183,1%. Die minimale Standardabweichung für das grüne Signal liegt bei 10,7 rfu bei einer DNA-Konzentration von 0,5 ng und für das blaue Signal bei 14,8 rfu für eine DNA-Konzentration von 0,125 ng. Die maximale Standardabweichung beträgt für das blaue Signal 552,2 rfu und für das grüne Signal 438 rfu bei einer DNA-Konzentration von 2 ng. Alle Werte, auf denen die folgenden Diagramme basieren sind in tabellarischer Form im Anhang unter der Diagrammnummerierung einzusehen. Zum Beispiel sind die Werte zum Diagramm 1 im Anhang unter dem Punkt 2.1 Diagramm 1 S.35 auf S.62 zu finden.

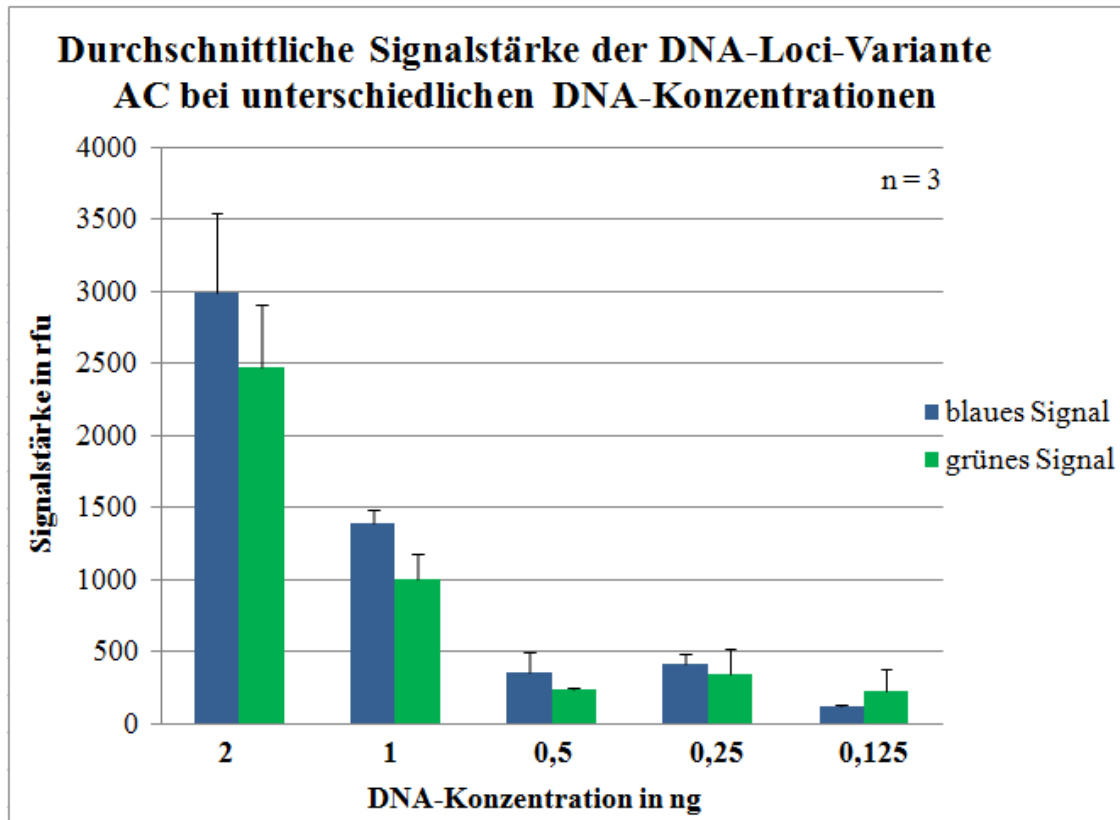


Diagramm 1: PD1 - Durchschnittliche Signalstärke (n = 3) der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Mengen (2 ng; 1ng; 0,5 ng; 0,25 ng; 0,125 ng). Es wurden jeweils drei Reaktionen (n = 3) bei den angegebenen DNA-Konzentrationen ausgeführt. Die Fragmente wurden bei einer Annealing-Temperatur von 66°C, einer Primer-Konzentration von 0,04 µM und innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

5.2.4 Verschiedene revA-Konzentrationen für die DNA-Loci-Variante AC

Bei diesem Versuch wurden unterschiedliche revA-Konzentrationen (0,04 µM; 0,045 µM; 0,05 µM) in die Reaktionen in Verbindung mit 1 ng DNA der DNA-Loci-Variante AC eingebracht, um das Verhältnis beider Signale zu untersuchen. Die Annealing-Temperatur lag bei 66°C, und die Reaktion lief innerhalb von 30 Zyklen ab. In Diagramm 2 S.36 sind die durchschnittlichen Signalstärken bei den verschiedenen Primer-Konzentrationen dargestellt. Zu erkennen ist, dass sich das Verhältnis von 78% bei einer Konzentration von 0,04 µM auf 86,2% bei einer revA-Konzentration von 0,045 µM steigert. Bei einer Konzentration des revA Primers von 0,05 µM übersteigt das grüne Signal das blaue und besitzt so einen Anteil von 119,1% des blauen Signals. Die minimale Standardabweichung für das grüne Signal beträgt bei einer revA-

Konzentration von 0,05 μM 12,7 rfu. Für das blaue Signal beträgt die geringste Standardabweichung 98,5 rfu bei einer revA-Konzentration von 0,045 μM . Die maximale Standardabweichung von 188,3 rfu für das blaue Signal wurde bei einer revA-Konzentration von 0,04 μM verzeichnet. Hingegen beträgt die maximale Standardabweichung des grünen Signals bei einer revA-Konzentration von 0,045 μM 155,6 rfu. Die Werte im Detail sind im Anhang einzusehen.

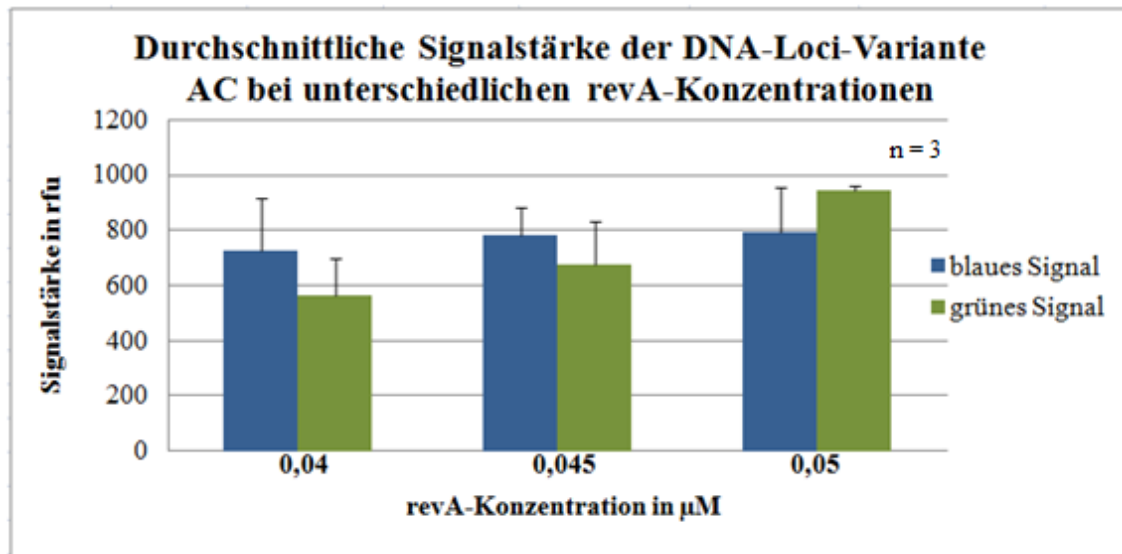


Diagramm 2: PD1 - Durchschnittliche Signalstärke (n = 3) der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revA-Konzentrationen. Die Reaktionen wurden unter Verwendung von 1 ng DNA bei gleichen Bedingungen dreimal durchgeführt (n = 3). Die Primer-Konzentration der Primer for + revC betrug in allen Reaktionen 0,04 μM . Die Konzentration des Primers revA wurde von 0,04 μM bis 0,05 μM variiert. Die Amplifikate wurden bei einer Annealing-Temperatur von 66°C und innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

5.2.5 Zehnfache Durchführung der Reaktion für die DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei gleichbleibenden Bedingungen

Für die DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC wurden jeweils zehn Reaktionen bei gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Reaktion lief innerhalb von 30 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 66°C und unter Verwendung von 1 ng DNA ab. Die Primer-Konzentration lag bei 0,04 μM für die Primer for und revC. Der Primer revA ging mit einer Konzentration von 0,045 μM in die Reaktion ein. In Diagramm 3 S.37 wird ersichtlich, dass für die DNA-Loci-Variante AA kein unerwünschtes Signal bei

allen zehn Reaktionen ermittelt werden konnte. Hingegen wurden beim Loci CC in zwei von zehn Reaktionen unerwünschte Signale mit einer durchschnittlichen Signalstärke ($n = 2$) von 634,5 rfu verzeichnet. Der Anteil des grünen Signals bei der DNA-Loci-Variante AC beträgt durchschnittlich 77,87%. Trotz gleichbleibender Bedingungen schwankte das grüne Signal mit einer minimalen Standardabweichung von 215,4 rfu und einer maximalen Standardabweichung von 334,5 rfu. Beim blauen Signal betrug die minimale Standardabweichung 268 rfu und die maximale Standardabweichung 285,22 rfu.

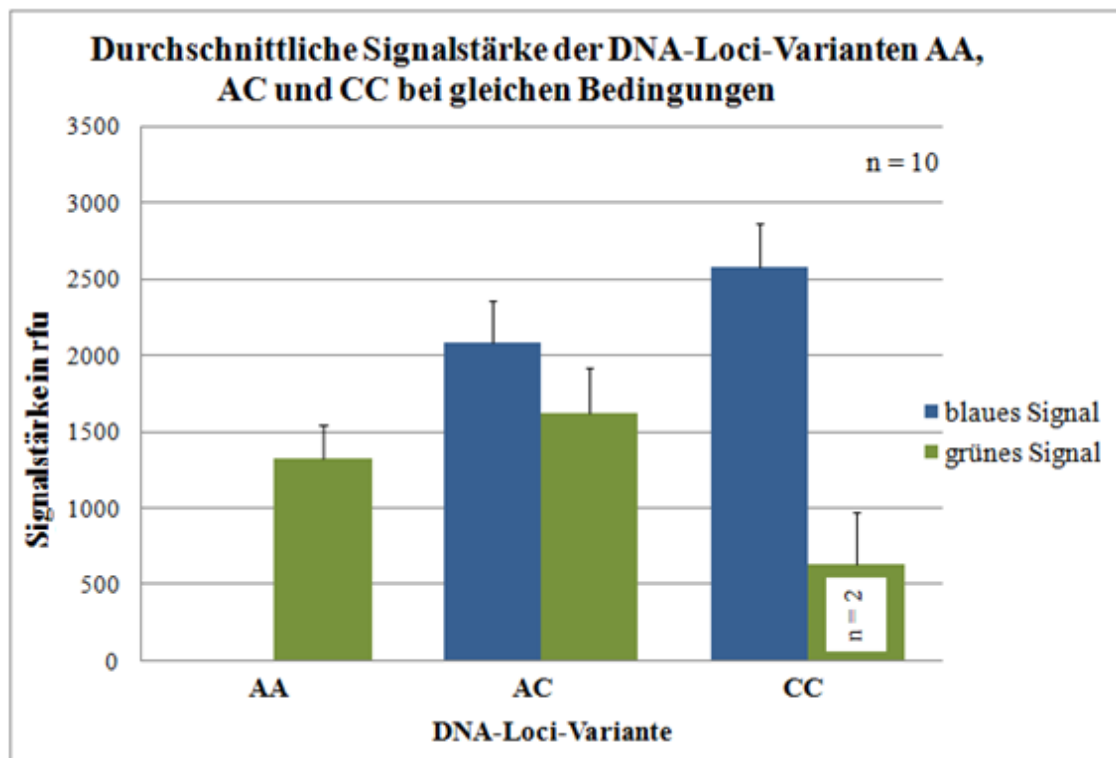


Diagramm 3: PD1 - Durchschnittliche Signalstärke ($n = 10$) der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei gleichbleibenden Bedingungen (AT 66°C). Die Reaktionen wurden unter Verwendung von 1 ng DNA bei gleichen Bedingungen zehnmal durchgeführt ($n = 10$). Die Primer-Konzentration der Primer for + revC betrug in allen Reaktionen 0,04 μ M und die des Primers revA 0,045 μ M. Die Amplifikate wurden bei einer Annealing-Temperatur von 66°C und innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

Aufgrund der unerwünschten grünen Signale bei der DNA-Loci-Variante CC wurde der Versuch bei einer Annealing-Temperatur von 67°C und 68°C für diese DNA-Loci-Variante wiederholt. Alle anderen Bedingungen wurden beibehalten. Dabei kann im Diagramm 4 S.38 beobachtet werden, dass das blaue Signal bei einer Annealing-Temperatur von 67°C um durchschnittlich 6,7% zunahm. Bei einer Annealing-

Temperatur von 68°C verringerte sich das Signal um 26,7% in Bezug auf das Ausgangssignal bei 66°C. Bei beiden Temperaturen konnte zudem ein vollständiger Ausschluss des unerwünschten grünen Signals nachgewiesen werden. Die geringste Standardabweichung von 201,72 rfu konnte bei einer Annealing-Temperatur von 68°C verzeichnet werden. Hingegen wurde die maximale Standardabweichung von 540,2 rfu bei einer Annealing-Temperatur von 67°C beobachtet.

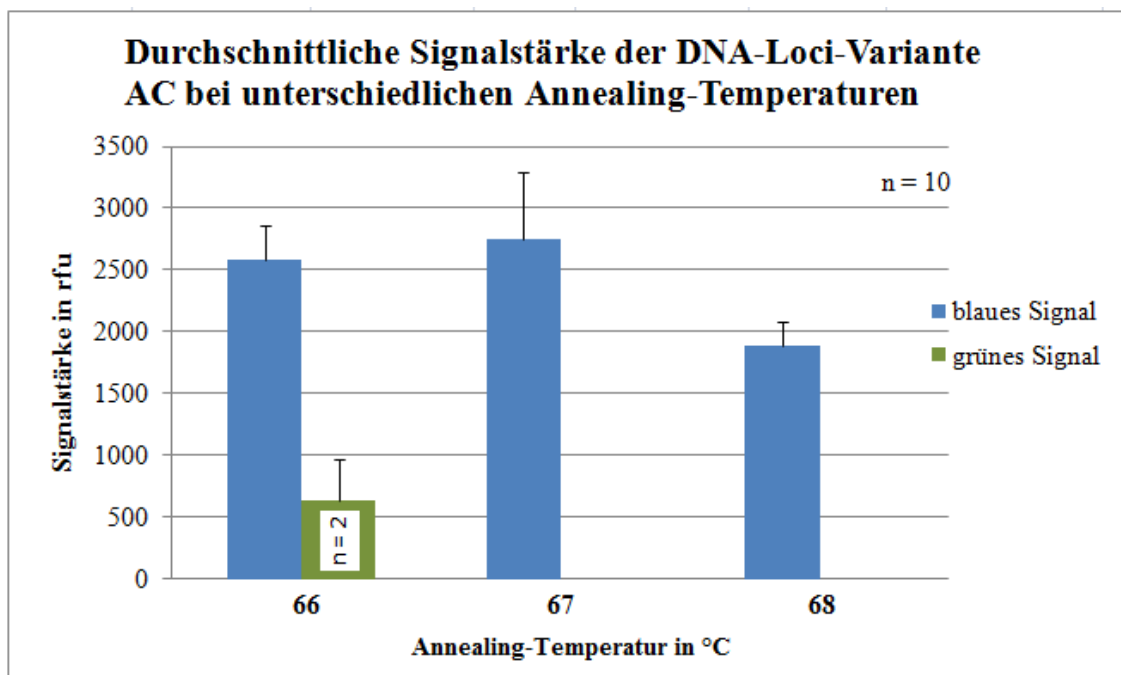


Diagramm 4: PD1 - Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Variante CC bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (AT 66°C, 67°C und 68°C). Die Reaktionen wurden unter Verwendung von 1 ng DNA bei gleichen Bedingungen zehnmal durchgeführt (n = 10). Die Primer-Konzentration der Primer for + revC betrug in allen Reaktionen 0,04 µM und die des Primers revA 0,045 µM. Die Amplifikate wurden bei einer Annealing-Temperatur von 66°C; 67°C und 68°C und innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

Da der Ausfall in allen zehn Reaktionen ab einer Annealing-Temperatur von 67°C nachgewiesen werden konnte, wurden die Reaktionen für die DNA-Loci-Variante AA und AC unter gleichen Bedingungen bei einer Annealing-Temperatur von 67°C wiederholt.

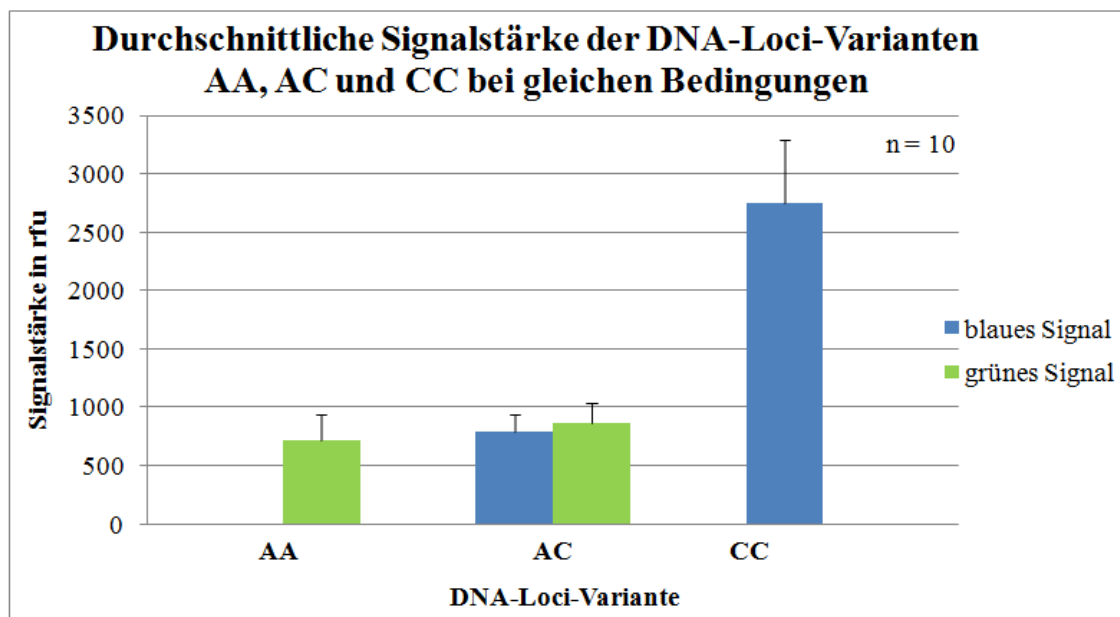


Diagramm 5: PD1 - Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei gleichbleibenden Bedingungen (AT 67°C). Die Reaktionen wurden unter Verwendung von 1 ng DNA bei gleichen Bedingungen zehnmal durchgeführt (n = 10). Die Primer-Konzentration der Primer for + revC betrug in allen Reaktionen 0,04 µM und die des Primers revA 0,045 µM. Die Amplifikate wurden bei einer Annealing-Temperatur von 67°C und innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

Wie dabei im Diagramm 5 ersichtlich wird, wurden sowohl bei der DNA-Loci-Variante AA als auch bei AC ähnlich schwache Signale von unter 1000 rfu ermittelt. Im Vergleich dazu ist das ermittelte blaue Signal der DNA-Loci-Variante CC mit durchschnittlich 2750 rfu fast dreimal so stark ausgeprägt. Des Weiteren wurde eine Zunahme des grünen Signals von der DNA-Loci-Variante AA zu AC von 16,8% verzeichnet. Das blaue Signal steigerte sich sogar um 71,4% von der DNA-Loci-Variante AC zu CC. Der Anteil des grünen am blauen Signal steigerte sich auf 109,5%. Die minimale und die maximale Standardabweichung für das grüne Signal betrugen 172 rfu bzw. 218,6 rfu. Für das blaue Signal variiert die Standardabweichung von minimal 154,6 rfu bis maximal 540,2 rfu.

5.3 Primerdesign 2

5.3.1 Ausschluss unerwünschter Signale

Die Primer-Auftrennung ergab bei einer Annealing-Temperatur von 66°C für die Primer-Kombination for + revA_tail in Verbindung mit der DNA-Loci-Variante CC ein unerwünschtes Signal von 385 rfu. Dabei wurden 2 ng DNA in die Reaktion eingebracht und das Produkt innerhalb von 35 Zyklen amplifiziert. Die Primer-Konzentration betrug 0,04 µM. Der Wildtyp-Primer erzeugte dabei ein Fragment von annähernd 169 bp. Die Länge des Fragmentes, welches durch den mutierten Primer erzeugt wurde beträgt etwa 166 bp.

Dieses unerwünschte Signal konnte durch das Herabsetzen der Zyklenzahl und die Verwendung von verschiedenen Annealing-Temperaturen ausgeschlossen werden. Die ersten fünf Zyklen liefen dabei bei einer Annealing-Temperatur von 66°C ab. In den folgenden 25 Zyklen wurde die Annealing-Temperatur auf 69°C angehoben.

In Abbildung 8 ist der Ausfall der Primer unter den oben genannten Bedingungen zu sehen.

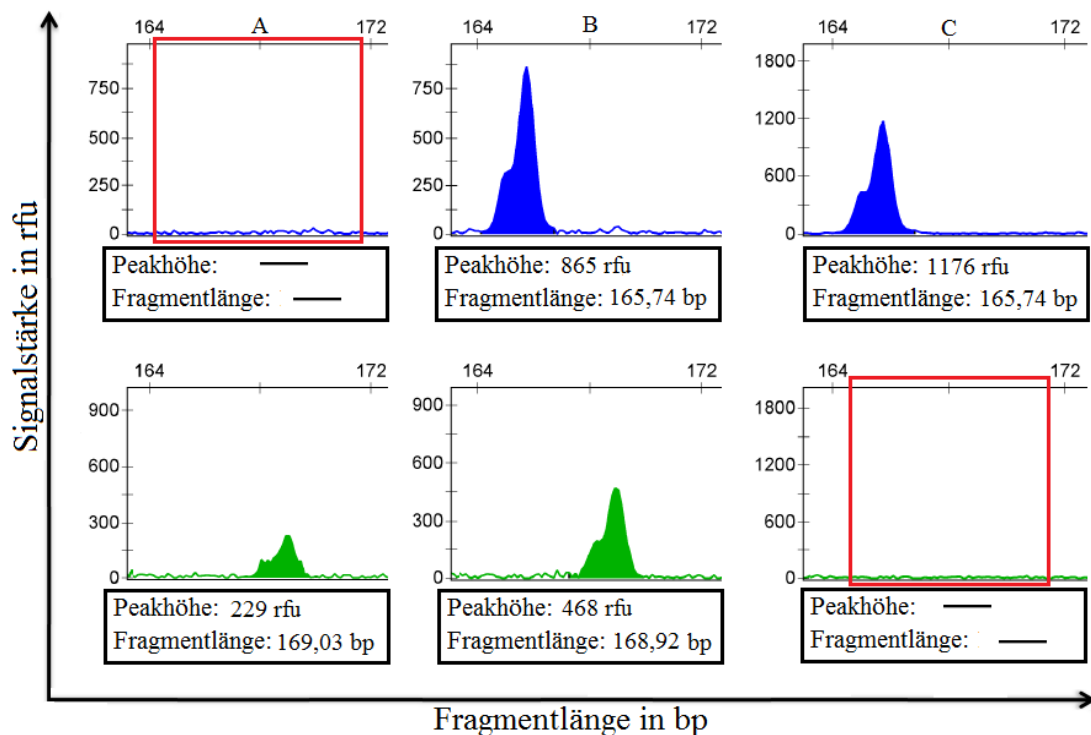


Abbildung 8: PD2 - Nachweis des Primer-Ausfalls im Primer-Mix bei aufgespaltenen PCR-Zyklen. Die Annealing-Temperatur betrug in den ersten fünf Zyklen 66°C und ab dem sechsten Zyklus 69°C. Die Konzentration der Primer betrug 0,04 µM. Unter Verwendung der Primer-Kombination

for + revA_tail + revC_tail wurde das Produkt innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert. In die Reaktion wurden 2 ng DNA eingebracht. A) DNA-Loci-Variante AA; B) DNA-Loci-Variante AC; C) DNA-Loci-Variante CC.

Jedoch wurden in diese Reaktion alle drei Primer eingebracht. Es ist zu erkennen, dass unter dem Teilabschnitt A im blauen Farbkanal und unter C im grünen Farbkanal (siehe rote Box Abbildung 8 S.40) kein unerwünschtes Signal verzeichnet werden konnte. Des Weiteren ist zu erkennen, dass der Ausgleich der Signale im Teilabschnitt B weiter angepasst werden muss.

5.3.2 Verschiedene revC_tail-Konzentrationen für die DNA-Loci-Variante AC

Da das blaue Signal in der vorhergehenden Reaktion deutlich stärker als das grüne war, wurden verschiedene revC_tail-Konzentrationen angelegt, um das Verhältnis beider Signale zueinander bei der DNA-Loci-Variante AC zu untersuchen. In die Reaktion wurden dabei 2 ng DNA und eine for und revA_tail-Konzentration von 0,04 μM eingebracht. Das Produkt wurde bei aufgetrennten Zyklen innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert. Die Annealing-Temperatur betrug in den ersten fünf Zyklen 66°C und ab dem sechsten Zyklus 69°C. In Diagramm 6 S.42 wird dabei ersichtlich, dass durch die Verringerung der Konzentration des Primers, der das blaue Signal erzeugt, das Verhältnis umgedreht wurde. Der beste Ausgleich innerhalb dieser Reaktion wurde bei einer Primer-Konzentration von 0,04 μM erzielt. Da jedoch das Verhältnis zuvor bei diesen Bedingungen stark von diesem Ausgleich abweicht, wurde für die weiteren Versuche eine revC_Primer-Konzentration von 0,035 μM beibehalten.

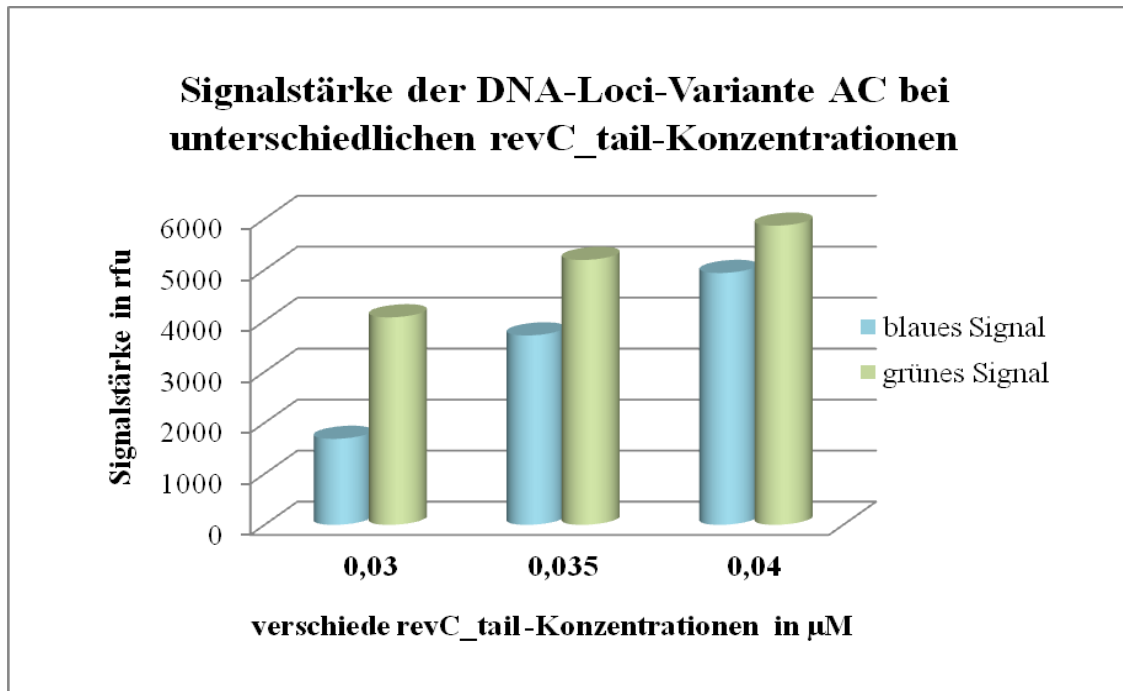


Diagramm 6: PD2 - Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revC_tail-Konzentrationen. Die Reaktionen erfolgten mit 2 ng DNA. Die Primer-Konzentration der Primer for + revA_tail betrug in allen Reaktionen 0,04 µM. Die Konzentration des Primers revC_tail wurde von 0,03 bis 0,04 µM variiert. Die Annealing-Temperatur betrug in den ersten fünf Zyklen 66°C und ab dem sechsten Zyklus 69°C. Das Produkt wurde innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

5.3.3 Zehnfache Durchführung der Reaktion für die DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei gleichbleibenden Bedingungen

Für die DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC wurden jeweils zehn Reaktionen bei gleichen Bedingungen durchgeführt. Das Produkt wurde bei aufgetrennten Zyklen innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert. Die Annealing-Temperatur betrug in den ersten fünf Zyklen 66°C und ab dem sechsten Zyklus 69°C. Es wurden 2 ng DNA in die Reaktion eingebracht. Die Primer-Konzentration lag bei 0,04 µM für die Primer for und revA_tail. Der Primer revC_tail ging mit einer Konzentration von 0,035 µM in die Reaktion ein. Für die DNA-Loci-Varianten AA und CC konnte bei allen zehn Reaktionen kein unerwünschtes Signal ermittelt werden (siehe Diagramm 7 S.43). Bei der DNA-Loci-Variante AC konnte ein durchschnittlicher Ausgleich des Verhältnisses beider Signale zueinander von 84,1% erwirkt werden. Für das blaue Signal wurde dabei eine minimale und maximale Standardabweichung von 172,32 rfu bzw. 226,28 rfu

ermittelt. Für das grüne Signal variierte die Standardabweichung von minimal 101,18 rfu bis zu maximal 144,11 rfu.

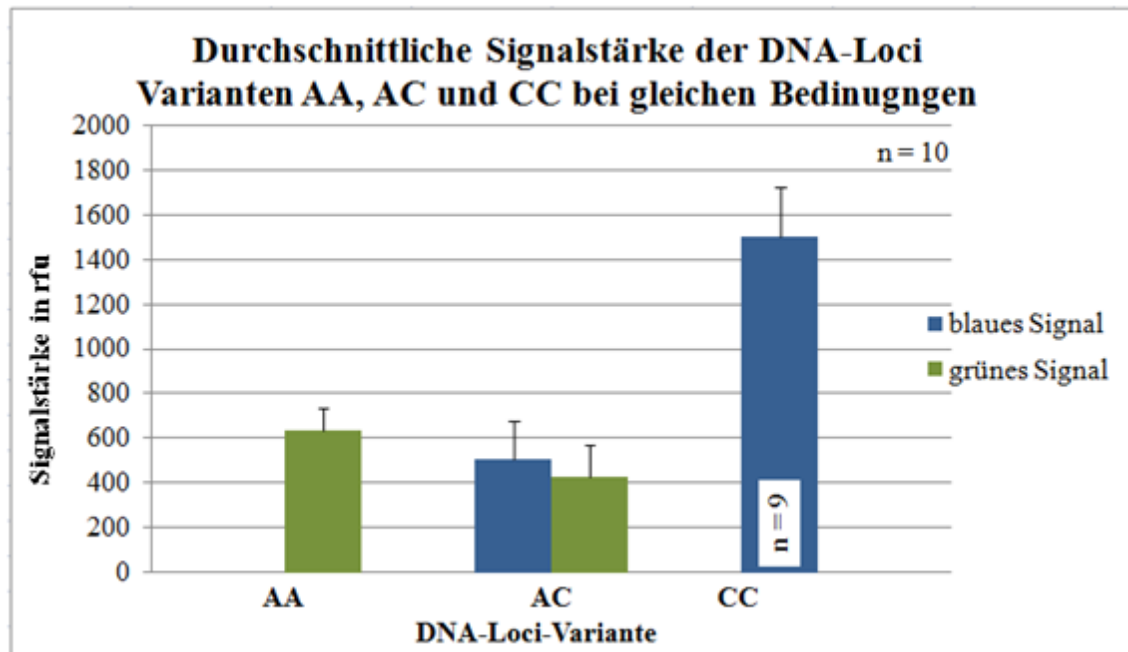


Diagramm 7: PD2 - Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei gleichbleibenden Bedingungen. Die Reaktionen wurden unter Verwendung von 2 ng DNA bei gleichen Bedingungen zehnmal durchgeführt (n = 10). Die Primer-Konzentration der Primer for + revA_tail betrug in allen Reaktionen 0,04 μ M und die des Primers revC_tail 0,035 μ M. Die Annealing-Temperatur betrug in den ersten fünf Zyklen 66°C und ab dem sechsten Zyklus 69°C. Das Produkt wurde innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

5.3.4 Verschiedene DNA-Konzentrationen in Verbindung mit der DNA-Loci-Variante AC

Für die DNA-Loci-Variante AC wurden jeweils drei gleiche Reaktionen bei Verwendung unterschiedlicher DNA-Mengen (2 ng; 1 ng; 0,5 ng; 0,25 ng; 0,125 ng) durchgeführt. Das Produkt wurde bei aufgetrennten Zyklen innerhalb von 32 Zyklen amplifiziert. Die Annealing-Temperatur betrug in den ersten fünf Zyklen 66°C und ab dem sechsten Zyklus 69°C. Die Primer-Konzentration lag bei 0,04 μ M für die Primer for und revA_tail. Der Primer revC_tail ging mit einer Konzentration von 0,035 μ M in die Reaktion ein. Im Diagramm 8 S.44 ist dabei die durchschnittlich ermittelte Signalstärke in Abhängigkeit der DNA-Konzentration dargestellt.

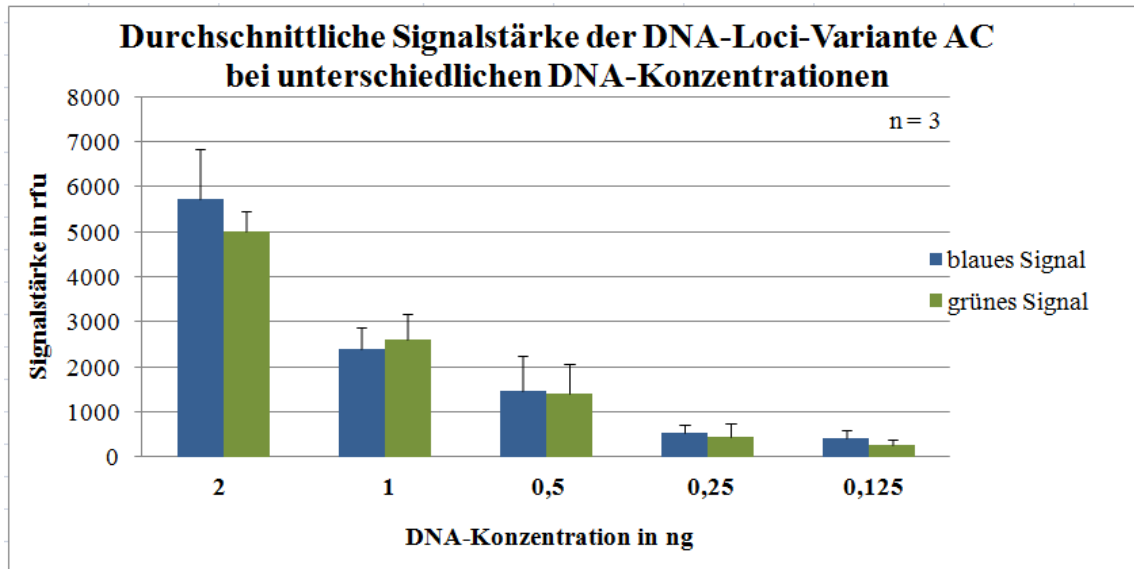


Diagramm 8: PD2 - Durchschnittliche Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Mengen (2 ng; 1ng; 0,5 ng; 0,25 ng; 0,125 ng). Die Reaktionen wurden bei gleichen Bedingungen dreimal durchgeführt ($n = 3$). Die Primer-Konzentration der Primer for + revA_tail betrug in allen Reaktionen $0,04 \mu\text{M}$ und die des Primers revC_tail $0,035 \mu\text{M}$. Die Annealing-Temperatur betrug in den ersten fünf Zyklen 66°C und ab dem sechsten Zyklus 69°C . Das Produkt wurde innerhalb von 32 Zyklen amplifiziert.

Das Verhältnis des grünen zum blauen Signal beträgt bei 2 ng DNA 87,1%, bei 0,5 ng 95,5%, bei 0,25 ng 86,7% und bei 0, 125 ng 66%. Bei einer DNA-Konzentration von 1 ng übersteigt der Anteil des grünen Signals das blaue Signal mit 108,6%. Des Weiteren fällt auf, dass unter Einsatz von 0,5 ng DNA der beste Ausgleich zwischen dem grünen und blauen Signal erzielt wurde. Die geringsten Unterschiede in den Signalstärken zeigten sich für das grüne und blaue Signal bei einer DNA-Konzentration von 0,125 ng, was sich in den berechneten Standardabweichungen widerspiegelt. Diese betragen für das grüne Signal 110,3 rfu und für das blaue Signal 176,9 rfu. Die stärkste Abweichung beträgt 1108,7 rfu für das blaue Signal bei einer DNA-Konzentration von 2 ng DNA. Für das grüne Signal ergab sich eine maximale Standardabweichung von 646,9 rfu bei einer DNA-Konzentration von 0,5 ng.

5.4 Primerdesign 3

In Tabelle 16 sind die ermittelten Signale für die Primer-Kombination forA + rev in Verbindung mit der DNA-Loci-Variante CC und die Primer-Kombination forC + rev in Verbindung mit der DNA-Loci-Variante AA dargestellt. In die Reaktion wurden 2 ng DNA eingebracht und das Produkt innerhalb von 35 Zyklen amplifiziert. Die Primer-Konzentration betrug 0,04 μ M. Dabei kann festgestellt werden, dass bis zu einer maximalen Annealing-Temperatur von 72°C in beiden Fällen kontinuierlich ein unerwünschtes Signal ermittelt wurde. Die Fragmentlänge des durch den Wildtyp-Primer erzeugten Signals betrug durchschnittlich 179,6 bp. Der mutierte Primer erzeugte hingegen ein Fragment der durchschnittlichen Länge von 177,4 bp. Die geringste Signalstärke für den grünen Farbkanal von 337 rfu wurde bei einer Annealing-Temperatur von 72°C ermittelt. Hingegen wurde im blauen Farbkanal eine minimale Signalstärke von 2895 rfu bei einer Annealing-Temperatur von 68°C verzeichnet. Zudem traten bei der Primer-Kombination forC + rev mehrfach positive Negativ-Kontrollen auf. Auf weiterführende Versuche wurde aufgrund dieser Ergebnisse verzichtet.

Tabelle 16: PD3 - Signalstärke der DNA-Loci-Variante CC in Verbindung mit der Primer-Kombination forA + rev und der DNA-Loci-Variante AA in Verbindung mit der Primer-Kombination forC + rev. In die Reaktion wurden 2 ng DNA eingebracht und das Produkt innerhalb von 35 Zyklen amplifiziert. Die Primer-Konzentration betrug in allen Reaktionen 0,04 μ M.

DNA-Loci-Variante	Primer-Kombination	Annealing [°C]	Probenbezeichnung	Y-Achse	
				Blau	Grün
CC	forA + rev	66	3.1	—	3879
		67	3.2	—	2488
		68	3.3	—	1701
		69	3.1	—	1490
CC	forA + rev	70	3.2	—	907
		71	3.3	—	527
		72	3.4	—	337
		72	3.4	—	337
AA	forC + rev	66	4.1	5434	—
		67	4.2	3784	—

DNA-Loci-Variante	Primer-Kombination	Annealing [°C]	Probenbezeichnung	Y-Achse	
				Blau	Grün
AA	forC+rev	68	4.3	2895	—
		69	4.1	7484	—
		70	4.2	7328	—
		71	4.3	7058	—
		72	4.4	7211	—

5.5 Sequenzierung nach Sanger

In Abbildung 9 ist ein Ausschnitt der Sequenzierung der Kontroll-DNA dargestellt. Dabei ist zu beobachten, dass es trotz eindeutiger Signale immer wieder zu einem Hintergrundrauschen bei einigen Basen kommt.

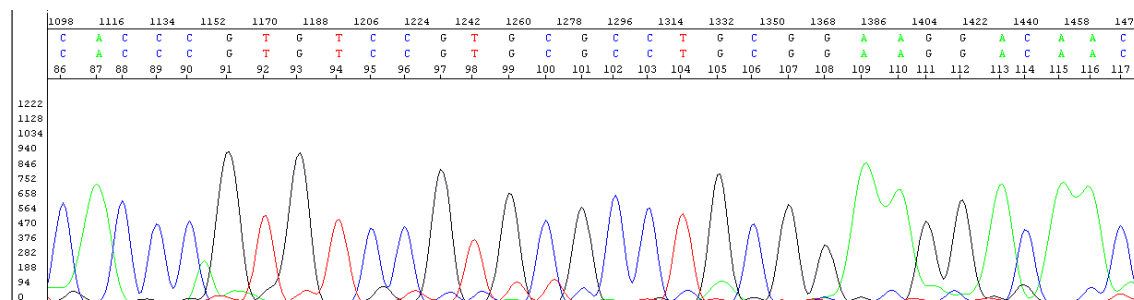


Abbildung 9: Hintergrundrauschen im Sequenzierungsergebnis der im Kit mitgelieferten Kontroll-DNA.

In Abbildung 10 S.47 sind die durch die Sequenzierung bestimmten Basen an der Position des SNPs A2690C dargestellt (schwarzes Rechteck). Für die DNA-Loci-Varianten AA und CC sind die Basen eindeutig, obwohl es in der Forward-Sequenzierung aller drei DNA-Loci-Varianten immer wieder zu dem eben erwähnten Hintergrundrauschen kommt. Die Reverse-Sequenz der DNA-Loci-Variante AA konnte nicht bestimmt werden. Hingegen scheint für die DNA-Loci-Variante AC und CC das Hintergrundrauschen bei der Reverse-Sequenzierung deutlich verringert zu sein.

Für die DNA-Loci-Variante AC konnten die Basen an der Position des SNPs A2690C sehr gut durch die Reverse-Sequenzierung bestätigt werden. Dabei wurden die Basen Thymin und Guanin durch einen nahezu hundertprozentig ausgeglichenen Doppelpeak

angezeigt. Jedoch sind die Allele der DNA-Loci-Variante AC auch in der Forward-Sequenzierung noch sehr gut zu erkennen. Für weitere Informationen zu den ausführlichen Sequenzen der Sequenzierung siehe im Anhang unter 3 Sequenzdetails aus der Sequenzierung nach Sanger S.75.

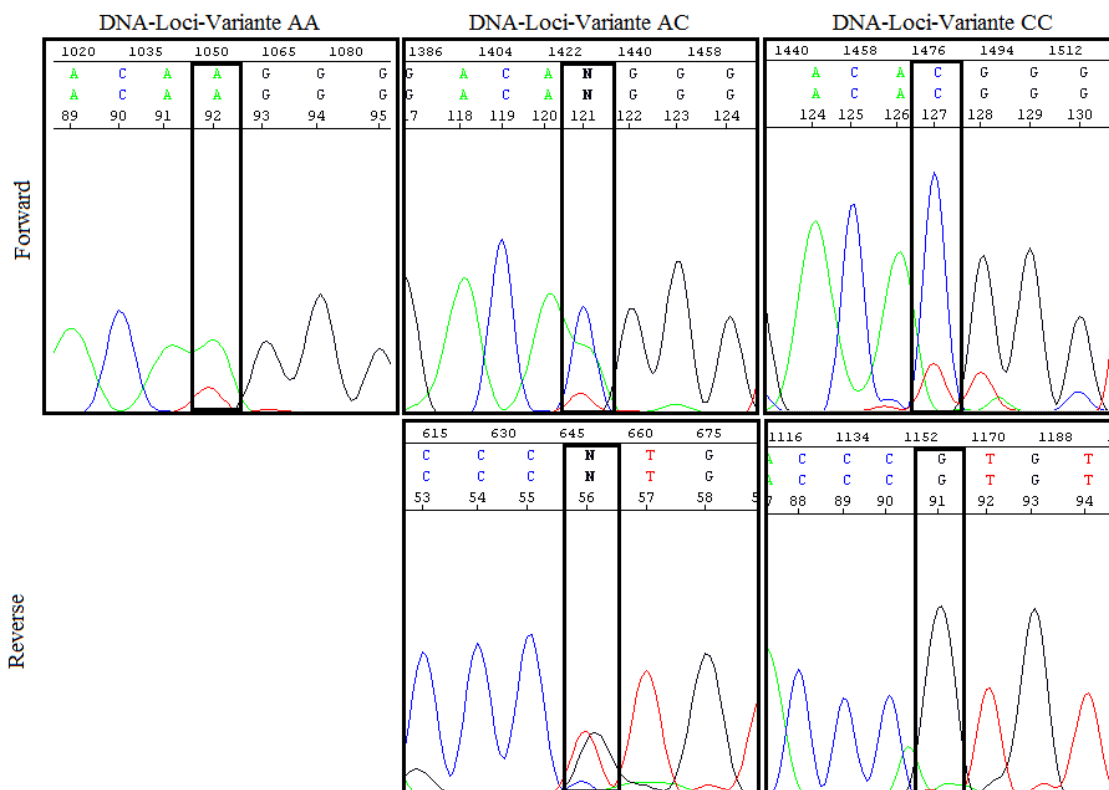


Abbildung 10: Darstellung des Sequenzierungsergebnis an der Position des SNP A2690C der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC. Der schwarz umrahmte Teil hebt dabei die Position des SNPs in den Elektropherogrammen hervor.

In Abbildung 11 S.48 werden die Sequenzdetails um den SNP A2690C (Position 0) dargestellt. Die möglichen benachbarten SNPs an den Positionen -10, 6, 9, 10, 15 und 16 sind durch den schwarzen Rahmen hervorgehoben. Dabei ist festzustellen, dass außer dem SNP A2690C kein weiterer Polymorphismus in den Primer-Sequenzen auftritt.

Proben- bezeichnung	Sequenz																
		-10			0			6		9	10			15	16		
NCBI	5 `	C	G	C	A	C	G	G	A	C	A	[A / C]	G	G	G	T	G
AA	5 `	C	G	C	A	C	G	G	A	C	A	[A]	G	G	G	T	G
AC	5 `	C	G	C	A	C	G	G	A	C	A	[A / C]	G	G	G	T	G
CC	5 `	C	G	C	A	C	G	G	A	C	A	[C]	G	G	G	T	G
NCBI	3 `	G	C	G	T	G	C	C	T	G	T	[T / G]	C	C	C	A	C
AC	3 `	G	C	G	T	G	C	C	T	G	T	[T / G]	C	C	C	A	C
CC	3 `	G	C	G	T	G	C	C	T	G	T	[G]	C	C	C	A	C

Abbildung 11: Sequenzierte Basen an den Positionen, an denen laut NCBI weitere Polymorphismen auftreten können. Der rot markierte Bereich bei den NCBI-Sequenzen gibt dabei den möglichen Basenaustausch für den SNP A2690C an. Hingegen werden durch den rot markierten Bereich bei allen anderen Sequenzen die detektierten Basen hervorgehoben.

6 Diskussion

Die in der Rechtsmedizin übliche Methode zur Bestimmung von SNPs ist die „Single Base Extension“ oder auch kurz SBE-Reaktion. Für diese Methode ist es zunächst notwendig die Zielsequenz zu vervielfältigen. Im Anschluss an die circa einstündige Aufreinigung mittels SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) und ExoI (Exonuklease I), bei der restliche Primer und dNTPs abgebaut werden, erfolgt die SBE-Reaktion. Darauf folgt eine erneute Aufreinigung mit SAP, bevor das Ergebnis mit Hilfe der Kapillarelektrophorese ausgewertet werden kann [Nastainczyk-Wulf 2012]. Die hier getestete Methode kann die Anzahl der Reaktionsschritte von vier auf einen beschränken, da die Detektion der Allelvarianten direkt im Anschluss an die PCR erfolgen kann. Somit würde sich der Zeitaufwand von mindestens einem Arbeitstag auf einen halben verringern. Sollte sich also herausstellen, dass diese Methode auch genauso gut im Multiplex-Verfahren funktioniert wie sie in der Einzelreaktion funktioniert hat, so wäre eine alternative, kostengünstige und Zeit-sparende Methode zur Bestimmung der SNPs gefunden, welche die SBE-Reaktion ablösen kann.

In Pettersson et al. 2003 wurde die Allel-spezifische PCR in Verbindung mit der Pyrosequenzierung getestet. Der Vorteil der Pyrosequenzierung liegt darin, dass neben der Zeitersparnis die Ergebnisse in Echtzeit nachverfolgt werden können. Des Weiteren wurde in Pettersson et al. eine zusätzliche unspezifische Fehlpaarung am 3'-Ende eingebaut. Dabei konnte durch die zusätzliche Fehlpaarung keine Veränderung der höchsten tolerierten Annealingtemperatur der spezifischen Primer verzeichnet werden. Andererseits wurde die maximale Annealingtemperatur der nicht-spezifischen Primer stark verringert, wobei keine falschen Signale bis zu einer minimalen Annealing-Temperatur von 40°C ermittelt werden konnten. Dies könnte sich als vorteilhaft für die Kombination mehrerer SNPs in der Multiplex-PCR erweisen.

6.1 Qualität der Primerdesigns 1, 2 und 3

Die Manipulationsmöglichkeiten für das Primerdesign, welches für Allel-spezifische Primer an eine bestimmte Position in einer Sequenz gebunden ist, sind stark eingeschränkt. Daraus ergibt sich für das Primerdesign 1 und 2, dass die Sequenzen dieser Primerdesigns mehr als drei gleiche aufeinander folgende Basen in ihrer Sequenz besitzen und somit die Wahrscheinlichkeit steigt, dass eine Fehlhybridisierung (siehe Abbildung 12 roter Kreis 2) oder eine Leserasterverschiebung auftritt. Eine solche Leserasterverschiebung kann sich durch einen Schulterpeak bzw. Vorpeak - wie in Abbildung 12 roter Kreis 1 dargestellt - bemerkbar machen. Beim dritten Primerdesign lässt sich nur schwer eine Leserasterverschiebung erkennen, da die Ergebnisse meist stark übersteuert waren und sich somit nur schwer eine Aussage treffen lässt. Jedoch kann gesagt werden, dass es beim Primerdesign 3 zu Fehlhybridisierungen (siehe Abbildung 13) kam. Ein Grund dafür kann sein, dass die Werte für die Selbstkomplementarität der Primer bzw. die Komplementarität der Primer untereinander zu hoch sind und es dadurch zur Ausbildung von Primer-Dimeren kommt.

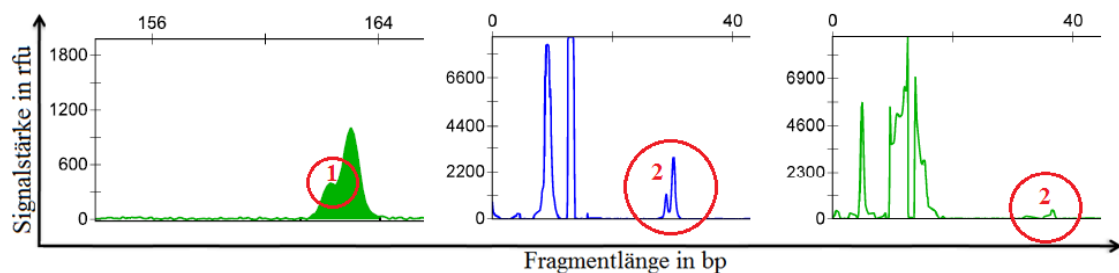


Abbildung 12: Mögliche Ausprägung einer Leserasterverschiebung (roter Kreis 1) und mögliche Ausprägung einer Fehlhybridisierung (roter Kreis 2).

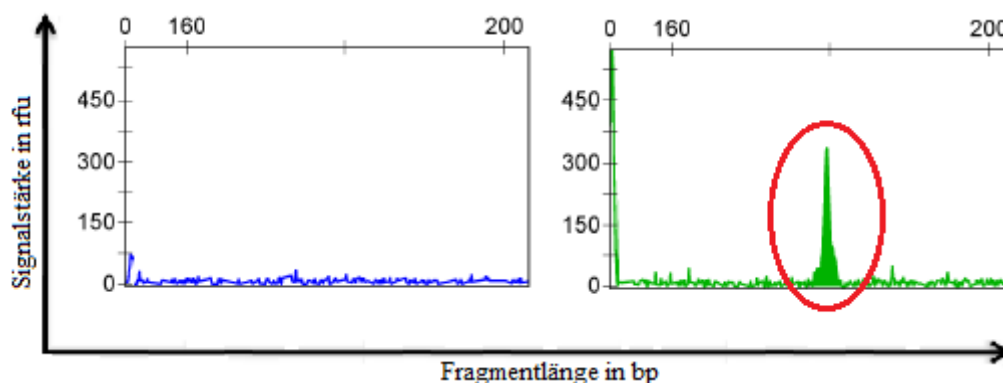


Abbildung 13: Beispiel einer Fehlhybridisierung beim Primerdesign 3. Hierbei erzeugte der Wildtyp-Forward-Primer forA ein Signal in Verbindung mit der mutierten genomischen DNA-

Loci-Variante CC. Die Reaktion lief bei einer Annealing-Temperatur von 72°C innerhalb von 35 Zyklen ab. Die Primer-Kombination forA + rev ging mit einer Konzentration von 0,04 µM in die Reaktion ein. Als Template wurden 2 ng DNA eingebracht.

Des Weiteren besitzen die Primer des Primerdesign 1 und 2 weniger als zwei C/Gs am 3'-Ende. Das sollte zu einer Verschlechterung der Bindung am 3'-Ende führen bzw. die Elongation negativ beeinflussen. Dies ist im Falle der Allel-spezifischen PCR möglicherweise ein Vorteil, da zu erwarten ist, dass der Primer mit der Fehlpaarung bei einer niedrigeren Annealing-Temperatur ausfällt. Des Weiteren besitzt nur der Reverse-Primer revA_tail vom Primerdesign 2 einen maximalen GC-Gehalt von 60%. Der GC-Gehalt korreliert dabei mit der Länge der Sequenz und dessen Schmelztemperatur. Dabei konnte kein Vorteil im Vergleich zu den anderen Primern festgestellt werden.

6.2 Primerdesign 1

Für das Primerdesign 1 wurden ein bis zwei Basen von den Reverse-Primern, die zuvor auf Funktionalität geprüft worden waren, entfernt, um die Schmelztemperatur der Primer zu verringern. Dabei konnte eine Verringerung der Schmelztemperatur von 2,1 K bis 2,28 K erreicht werden. Diese Verringerung der Schmelztemperatur führt zu einem früheren Primer-Ausfall, der anstatt bei 69°C schon bei 67°C eintritt [Mergner 2013]. Auch hier tritt der Ausfall erst ein, wenn die gewählte Annealing-Temperatur oberhalb der Schmelztemperatur der Primer liegt. Dies bedeutet, dass der Ausfall erst eintritt, wenn weniger als 50% der Primer an das Template binden.

Aus der Sequenzierung ist bekannt, dass in der Primer-Sequenz keine weiteren Mutationen vorliegen. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Fehlpaarung ausreicht, um den Primer so zu destabilisieren, dass die Polymerase nicht mehr binden kann bzw. keine Elongation mehr stattfindet. Somit wird keine detektierbare Menge des PCR-Produktes oder gar kein PCR-Produkt erzeugt. Durch Verwendung verschiedener DNA-Konzentrationen konnte die untere Nachweisgrenze bestimmt werden. Diese liegt etwa bei einer DNA-Konzentration von 0,25 ng. Bei einer DNA-Konzentration von 0,125 ng lagen fünf der sechs ermittelten Signale (grün und blau) unterhalb von 200 rfu. Eine sichere Detektion der Allele ist somit unter den gewählten Bedingungen nicht mehr

möglich. Dabei könnte die Zyklenzahl von 30 Zyklen weiter angehoben werden, um somit aus weniger DNA mehr Produkte zu gewinnen.

6.3 Primerdesign 2

Für das Primerdesign 2 ergab sich keine Senkung der Schmelztemperatur. Im Gegenteil, da diese mit der Länge der Sequenz und dem GC-Gehalt korreliert, wurde durch das Anfügen der Tails sogar eine geringe Steigerung der Schmelztemperatur von 0,25 K bis 0,48 K hervorgerufen. Dabei konnte durch den Tail der GC-Gehalt der Sequenzen um 10,77% bzw. 25% gesenkt werden. Der Primer-Ausfall kam erst dann zustande, als die Annealing-Temperatur nach den ersten fünf PCR-Zyklen von 66°C auf 69°C angehoben wurde. Das bedeutet, dass trotz geringer Steigerung in der Annealing-Temperatur eine geringfügige Verbesserung im Vergleich zu den auf Funktionalität geprüften Primern verzeichnet werden konnte [Mergner 2013]. Des Weiteren tritt der Ausfall der Primer - wie eben beim Primerdesign 1 beschrieben - erst oberhalb der Schmelztemperatur auf. Auch in den Sequenzen des Primerdesigns 2 konnten durch die Sequenzierung keine weiteren Polymorphismen bestätigt werden. Die untere Nachweisgrenze für dieses Primerdesign wurde bei den Versuchen nicht erreicht. Bei einer DNA-Konzentration von 0,125 ng waren drei der sechs Signale (grün und blau) deutlich stärker als 200 rfu.

6.4 Primerdesign 3

Bei diesem Primerdesign wurde eine Ankersequenz erzeugt, deren Schmelztemperatur oberhalb von 75°C lag und deren Aufgabe darin bestand, den sequenzspezifischen Teil in die Region des SNPs zu bringen. Der Spacer, welcher nicht an die genomische DNA bindet, sollte dabei als flexibler Abstandshalter dienen. Prinzipiell funktionierte dieses Konstrukt, da Fragmente der gewünschten Größe von näherungsweise 177 bp und 180 bp erzeugt wurden. Jedoch konnte bis zu einer Annealing-Temperatur von 72°C kein Ausfall nachgewiesen werden. Dies liegt vermutlich daran, dass sobald das zweite Produkt gebildet wurde, der Primer über die komplette Länge von 58 bzw. 60 Basen bindet. Da die Sequenzierung auch hier keine weiteren Polymorphismen in den Sequenzen ergab, bedeutet dies, dass die eine Fehlpaarung energetisch nicht ausreicht,

um das ganze Konstrukt zu destabilisieren und somit immer ein Produkt in einer unspezifischen Reaktion gebildet wird.

6.5 Vergleich der Primerdesigns 1 und 2

Das Primerdesign 3 wird aufgrund seiner unspezifischen Reaktion nicht mit in den Vergleich einbezogen. Prinzipiell kann gesagt werden, dass das Primerdesign 1 im Vergleich zum Primerdesign 2 bessere Ergebnisse liefert. Einerseits benötigt das Primerdesign 1 den geringeren Aufwand, da kein Tail erzeugt und mit den Produkten abgeglichen werden muss. Andererseits besitzt dieses Primerdesign einen größeren Spielraum bis zur maximalen Annealing-Temperatur von 72°C. In Verbindung mit der geringeren Basenanzahl und dem geringeren Arbeitsaufwand sollte sich auch eine Kostenersparnis im Vergleich zum Primerdesign 2 abzeichnen.

Auch für das Primerdesign 2 konnte die Funktionsfähigkeit nachgewiesen werden. Dabei konnte durch die verkürzten Primer in Verbindung mit den Tails eine stärkere Auftrennung der Signale erreicht werden, wodurch die Signale besser von Durchschlägen unterschieden werden können. Bezüglich der unteren Nachweisgrenze der eingesetzten DNA schneidet das Primerdesign 2 besser ab. Die untere Nachweisgrenze ist beim Primerdesign 1 ab 0,25 ng DNA erreicht. Hingegen waren beim Primerdesign 2 noch deutliche Signale bei 0,125 ng DNA detektierbar. Eine Kombination beider Primerdesigns ist in der Multiplex-PCR denkbar und vermutlich sinnvoll. So können bei Bedarf der GC-Gehalt und die Schmelztemperatur an bestimmte Reaktionsbedingungen angepasst werden.

6.6 Sequenzierung nach Sanger

In der Sequenzierungsreaktion konnte in allen Proben ein geringes Hintergrundrauschen verzeichnet werden. Da dieses auch bei der Positiv-Kontrolle der Fall war, sind Verunreinigungen aus den vorhergehenden Reaktionen auszuschließen. Dabei kann das Hintergrundrauschen durch Einsatz von zu viel DNA oder einer zu hohen Primer-Konzentration verursacht worden sein. Des Weiteren konnte die Reverse-Sequenz der DNA-Loci-Variante AA nicht bestimmt werden. Die Rohdaten zeigten dabei zu Beginn

der Reaktion eine starke Überlagerung der Signale mit einem Auflösungsverlust und fielen dann stark ab. Da jedoch die Sequenzierung der Forward-Sequenz erfolgreich war und in die Sequenzierungsreaktion dasselbe Produkt nur mit unterschiedlichen Primer eingebracht wurde, wäre lediglich ein Problem in der Aufreinigung denkbar. Dies bestätigt sich auch durch die erfolgreiche Reverse-Sequenzierung der DNA-Loci-Varianten AC und CC, denn dadurch konnte ein Primer-spezifisches Problem ausgeschlossen werden [URL-4].

7 Ausblick

Im Anschluss an diese Arbeit können weitere Untersuchungen zur unteren Nachweisgrenze erfolgen. Dabei kann untersucht werden, ob sich durch eine Erhöhung der Zyklenzahl die eingesetzte DNA-Menge weiter senken lässt, da bei Identifizierungsuntersuchungen oft wenig DNA-Material zur Verfügung steht. Des Weiteren können weitere Optimierungen am PCR-Protokoll vorgenommen werden, um dieses so an eine optimale Reaktionsdauer anzupassen und eine erhöhte Zeitersparnis zu erzielen. Auch kann die Annealing-Temperatur des Primerdesign 2 weiter untersucht werden, um festzustellen, ob eine Annealing-Temperatur existiert, bei dem der Ausfall auch ohne Aufsplittung der Zyklen eintritt. Um das Hintergrundrauschen in der Sequenzierung zu verringern bzw. vollständig zu entfernen, kann versucht werden, die DNA-Menge und die Primer-Konzentration zu variieren. Zudem empfiehlt sich eine Optimierung der Aufreinigung, da davon auszugehen ist, dass deswegen die Reverse-Sequenzierung der DNA-Loci-Variante AA nicht funktionierte. Schließlich sollen mehrere SNPs mithilfe der Allel-spezifischen PCR in einer Multiplex-PCR zusammengefasst werden. Dabei sollen SNPs Anwendung finden, die zur Identifizierung genutzt werden und in einer Liste von 52 SNPs - erhältlich bei SNP for ID - zusammengefasst sind. Der nächste Schritt dabei ist, die Sequenzen der 52 SNPs auf Problemsequenzen zu untersuchen und diese zunächst im Testverfahren auf Funktionalität zu überprüfen.

8 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit dem Vergleich und der Optimierung drei unterschiedlicher Primerdesigns zur Detektion von SNPs mittels Allel-spezifischer PCR. Dabei wurden zwei verschiedene Primerdesigns erzeugt, die auf der Grundlage eines zuvor auf Funktionalität getesteten Primerdesigns basieren. Für das Primerdesign 1 wurden ein bis zwei Basen von den auf Funktionalität getesteten Primersequenzen entfernt, um die Schmelztemperatur der Primer zu senken. Für das Primerdesign 2 wurden an die Primersequenzen des Primerdesigns 1 zur genomischen DNA nicht komplementäre Tails angehängt. Der damit erzeugte Abstand zwischen den beiden Signalen diente dabei der stärkeren Signalauftrennung, um die ermittelten Signale besser von Durchschlägen unterscheiden zu können. Die Richtung des Primerdesigns 3 wurde aufgrund der Verteilung der benachbarten SNPs von A2690C gedreht. Dieses Primerdesign besteht aus einer Ankersequenz ($T_m > 75^\circ\text{C}$), einem nicht zur genomischen Sequenz komplementären Spacer und einem Sequenz-spezifischen 3'-Ende. Die Sequenzierung der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC ergab keine weiteren Mutationen innerhalb der Primer-Konstrukte außer der gewünschten. Somit wird die Erzeugung der Nullallele beim Primerdesign 1 und 2 nur durch die Fehlpaarung einer Base hervorgerufen. Die Funktionalität des Primerdesign 3 konnte nicht bestätigt werden. Das Primerdesign 3 erzeugt zwar Fragmente der gewünschten Größe, jedoch konnte bis zu einer Annealing-Temperatur von 72°C kein Nullallel erzeugt werden. Da zwar ein Produkt der gewünschten Länge entsteht, die Primer jedoch nicht ausfallen, kann davon ausgegangen werden, dass die Fehlpaarung einer Base nicht ausreicht, um das gesamte Konstrukt (58 bis 60 Basen) so zu destabilisieren, dass die Polymerase nicht mehr binden kann und es zur Ausbildung eines Nullallels kommt. Im Vergleich zwischen Primerdesign 1 und 2 lieferte das Primerdesign 1 etwas bessere Ergebnisse. Der Ausfall tritt dabei beim Primerdesign 1 schon ab einer Annealing-Temperatur von 67°C ein. Für das Primerdesign 2 hingegen wurde erst die Ausbildung eines Nullallels verzeichnet, als die Temperatur nach dem fünften Zyklus von 66°C auf 69°C angehoben wurde. Des Weiteren entfällt beim Primerdesign 1 die Erzeugung und der Abgleich des Tails mit den entstehenden Produkten. Somit ergibt sich für dieses Primerdesign ein Vorteil in Bezug auf die Kosten- und den Zeit- und

Arbeitsaufwand. Die untere Nachweisgrenze liegt beim Primerdesign 1 bei 0,25 ng DNA. Hingegen wurde beim Primerdesign 2 die untere Nachweisgrenze auch bei 0,125 ng DNA noch nicht erreicht. Der nächste Schritt besteht darin, mehrere SNPs mithilfe der Allel-spezifischen PCR in einer Multiplex-PCR zusammenzufassen. Eine Kombination beider Primerdesigns ist dabei in der Multiplex-PCR denkbar und vermutlich sinnvoll. So können bei Bedarf Signale, die durch die Primer von verschiedenen SNPs erzeugt werden und nah beieinander liegen, stärker aufgetrennt werden. Zudem kann dadurch der GC-Gehalt und die Schmelztemperatur an bestimmte Reaktionsbedingungen angepasst werden. Sollte sich der Ausfall der Primer auch in der Multiplex-PCR bestätigen, so wäre die Allel-spezifische PCR eine günstige und zeitsparende Alternative zu der in der Rechtsmedizin üblichen zeit- und kostenintensiven SBE-Reaktion.

9 Summary

This paper examines the comparison and optimization of three different primer designs for SNP-detection using allele-specific PCR. Two different designs of primers were generated on the basis of a primer design previously tested for functionality. One or two bases were removed from the primer to reduce the melting temperature. Therefore the primer design 2 tails, which are non-complementary to the genomic DNA, were appended to the 5'-end of the primer sequences of the primer design 1. In this way the distance between genotype peaks increased, so it was simpler to detect off-scale peaks. The direction of the primer design 3 was rotated due to the distribution of neighbor SNPs of A2690C. This design consists of an anchor sequence (melting temperature > 75°C), a spacer, which is non-complementary to genomic DNA, and a sequence-specific 3'-end. Sequencing of the DNA region variants AA, AC, and CC showed no further mutations, except the required ones, located in the primer constructs. For the Primer designs 1 and 2, the mismatch of one base causes the generation of null alleles. The functionality of the primer design 3 could not be confirmed. Although the primer design 3 produced fragments of the required size, a null allele could not be produced up to an annealing temperature of 72° C. Thus one base is not enough to destabilize a primer, which is between 58 and 60 bases long. In comparison to Primer design 2, Primer design 1 showed better results. For Primer design 1 drop-out was detected at an annealing temperature of 67°C. By increasing the annealing temperature after the fifth cycle from 66°C to 69°C drop-out could be observed at Primer design 2. Furthermore, the primer design 1 eliminates the necessity to produce a tail and the alignment of the tail with the resulting products. Hence it is an advantage in terms of cost and time respectively effort. The detection limit for Primer design 1 is reached at a DNA concentration of 0.25 ng DNA. In contrast, the primer design 2 showed a detection limit below 0.125 ng DNA. The next step is to summarize several SNPs using allele-specific PCR in a multiplex reaction. A combination of both primer designs is also conceivable and probably useful in multiplex PCR. Thus, if necessary, signals of different SNPs can be better separated by using various primer designs. Moreover, this can prevent the GC content and the melting temperature to be adapted to specific reaction conditions. If

drop-out of the primer signals can be observed in multiplex PCR, too, the allele-specific PCR can be an economical and time-saving alternative for the time- and cost-intensive conventional method of the single base extension in forensic science.

Literaturverzeichnis

Clark, D.P. und Pazdernik, N.J. (2009). *Molekulare Biotechnologie - Grundlagen und Anwendungen.* Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2009.

Dettmeyer, R.B. und Verhoff, M.A. (2011). *Rechtsmedizin.* Heidelberg : Springer Medizin Verlag, 2011.

Foernzler, D. (2000). *SNPs – kleine Unterschiede mit großer Wirkung.* BioWorld, 2000.

Kowal, A.B. (2007) *Die Bedeutung von bestimmten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen für das durch Naturlatex verursachte allergische Asthma.* Seite: 17 Bochum : Ruhr-Universität Bochum, Hohe Medizinische Fakultät, Inaugural-Dissertation.

Gressner A.M. und Arndt T. (2013). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.* 2. Auflage: Berlin, Heidelberg : Springer Verlag, 2013.

Gey, M.H. (2008). *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik.* Berlin Heidelberg : Springer Verlag, 2008.

Mülhardt, C. (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.* 6. Auflage: Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2009.

Mergner, A. (2013). *Erarbeitung einer SNP-Analyse-Methode mittels konkurrierender PCR-Primer.* Mittweida: Hochschule Mittweida, Fakultät für Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Praktikumsbericht.

Nastainczyk-Wulf, M. (2012). *Etablierung einer Mutationsanalyse beim Long QT-Syndrom.* Leipzig: Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Dissertation.

Pettersson M., Bylund M. und Alderborn A. (2003). *Molecular haplotype determination using allele-specific PCR and Pyrosequencing technology.* Genomics Vol.82, Seite 390 - 396.

URL-1 (03.08.2013). Unbekannt: *Einleitung*. URL: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000000951/04_Einleitung.pdf;jsessionid=E3D3885967F828B9546DAE1F15516593?hosts=

URL-2 (03.08.2013). VanLang C.C. *Qiagen Buffers*.
URL: http://openwetware.org/wiki/Qiagen_Buffers

URL-3 (10.06.2013). Unbekannt: *Ergebnisse*. URL: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000001624/05_5_Ergebnisse.pdf?hosts=

URL-4 (11.08.2013). Unbekannt: *Troubleshooting*. URL: http://www.uni-due.de/medizin/dna/troubleshooting_02.shtml

Anhang

1 DNA-Quantifizierung

Tabelle 17: In der Real-Time PCR ermittelte DNA-Konzentration.

DNA-Loci-Variante	DNA-Isolierung	DNA-Menge [ng/μl]
AA	1	14,9719
	2	15,5900
AC	1	9,0524
	2	19,3000
CC	1	5,6135
	2	42,9100

2 Diagrammdetails

2.1 Diagramm 1 S.35 - PD1- Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen.

Tabelle 18: PD1 - Werte zum Diagramm 1. Durchschnittliche Signalstärke (n = 3) der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Mengen (2 ng; 1ng; 0,5 ng; 0,25 ng; 0,125 ng). Es wurden jeweils drei Reaktionen (n = 3) bei den angegebenen DNA-Konzentrationen ausgeführt. Die Fragmente wurden bei einer Annealing-Temperatur von 66°C, einer Primer-Konzentration von 0,04 μM und innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
			Blau	Grün
AC	2	b1.1	3316	2914
		b1.2	2358	2038
		b1.3	3313	2466
		Mittelwert	2995,67	2472,67
		Standardabweichung [rfu]	552,2376	438,0381
		Mittelwert X-Achse [bp]	161,14	163,12
		Anteil [%] Grün von Blau	82,54	
	1	b2.1	1496	1204
		b2.2	1339	932

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
			Blau	Grün
AC	1	b2.3	1353	890
		Mittelwert	1396,0	1008,67
		Standardabweichung [rfu]	86,89	170,4621
		Mittelwert X-Achse [bp]	161,16	154,13
		Anteil [%] Grün von Blau	72,25	
	0,5	b3.1	482	234
		b3.2	382	248
		b3.3	196	227
		Mittelwert	353,3	236,3
		Standardabweichung [rfu]	145,14	10,69
		Mittelwert X-Achse [bp]	161,09	163,12
		Anteil [%] Grün von Blau	66,88	
	0,25	b4.1	485	464
		b4.2	430	429
		b4.3	342	151
		Mittelwert	419,0	348,0
		Standardabweichung [rfu]	72,13	171,50
		Mittelwert X-Achse [bp]	161,16	163,13
		Anteil [%] Grün von Blau	83,06	
	0,125	b5.1	129	402
		b5.2	105	144
		b5.3	132	124
		Mittelwert	122,0	223,3
		Standardabweichung [rfu]	14,79	155,05
		Mittelwert X-Achse [bp]	161,19	163,12
		Anteil [%] Grün von Blau	183,06	

2.2 Diagramm 2 S.36 - PD1 - Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revA-Konzentrationen.

Tabelle 19: PD1 - Werte zum Diagramm 2. Durchschnittliche Signalstärke (n = 3) der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revA-Konzentrationen. Die Reaktionen wurden unter gleichen Bedingungen dreimal durchgeführt (n = 3). Die Primer-Konzentration der Primer for + revC betrug in allen Reaktionen 0,04 µM. Die Konzentration des Primers revA wurde von 0,04 µM bis 0,05 µM variiert. Die Amplifikate wurden bei einer Annealing-Temperatur von 66°C und innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	revA [µM]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
				Blau	Grün
AC	1	0,04	b1.1	588	425
			b1.2	940	689
			b1.3	648	583
			Mittelwert	725,3	565,67
			Standardabweichung [rfu]	188,31	132,8508
			Mittelwert X-Achse [bp]	161,19	163,11
			Anteil [%] Grün von Blau	77,99	
		0,045	b2.1	894	835
			b2.2	703	669
			b2.3	757	524
			Mittelwert	784,67	676,0
			Standardabweichung [rfu]	98,4598	155,62
			Mittelwert X-Achse [bp]	161,18	163,10
			Anteil [%] Grün von Blau	86,15	
		0,05	b3.1	923	956
			b3.2	846	932
			b3.3	614	951
			Mittelwert	794,3	946,3
			Standardabweichung [rfu]	160,85	12,66
			Mittelwert X-Achse [bp]	161,21	163,17
			Anteil [%] Grün von Blau	119,14	

2.3 Diagramm 3 S.37 - PD1 - Zehnfache Durchführung der Reaktion in Verbindung mit den DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei konstanten Bedingungen (AT 66°C).

Tabelle 20: PD1 - Werte zum Diagramm 3. Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC bei konstanten Bedingungen (AT 66°C). In die Reaktion ging eine Primer-Konzentration für die Kombination for + revC von 0,04 µM und revA 0,045 µM ein. Die Reaktionen wurden unter gleichen Bedingungen zehnmal durchgeführt (n = 10). Die Amplifikate wurden bei einer Annealing-Temperatur von 66°C und innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Probenbezeichnung	Y-Achse	
			Blau	Grün
AA	1	a1	—	1335
		a2	—	1429
		a3	—	856
		a4	—	1459
		a5	—	1431
		a6	—	1051
		a7	—	1281
		a8	—	1442
		a9	—	1568
		a10	—	1412
	1	Mittelwert	—	1326,4
		Standardabweichung [rfu]	—	215,35
		Mittelwert X-Achse [bp]	—	163,07
AC		b1	1717	1668
		b2	1997	1843
		b3	2356	1368
		b4	1757	1434
		b5	1883	1283
		b6	2056	1647
		b7	1993	1475

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Probenbezeichnung	Y-Achse	
			Blau	Grün
AC	1	b8	2227	2313
		b9	2391	1548
		b10	2483	1665
		Mittelwert	2086,0	1624,4
		Standardabweichung [rfu]	268,02	293,02
		Mittelwert X-Achse [bp]	161,14	163,10
		Anteil [%] Grün von Blau	77,87	
CC		c1	2434	398
		c2	2331	871
		c3	2979	—
		c4	2468	—
		c5	2425	—
		c6	2711	—
		c7	2909	—
		c8	2411	—
		c9	2934	—
		c10	2163	—
	Mittelwert	2576,5	634,5	
	Standardabweichung [rfu]	285,22	334,46	
	Mittelwert X-Achse [bp]	161,12	163,02	

2.4 Diagramm 4 S.38 PD1 - Zehnfache Durchführung der Reaktion in Verbindung mit der DNA-Loci-Variante AC bei konstanten Bedingungen (AT 66°C, 67°C und 68°C).

Tabelle 21: PD1 - Werte zum Diagramm 4. Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Variante AC bei konstanten Bedingungen (AT 66°C, 67°C und 68°C). In die Reaktion ging eine Primer-Konzentration für die Kombination for + revC von 0,04 µM und revA 0,045 µM ein. Die Reaktionen wurden unter gleichen Bedingungen zehnmals durchgeführt (n = 10). Die Amplifikate wurden bei einer Annealing-Temperatur von 66°C, 67°C, 68°C und innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Annealing [°C]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
				Blau	Grün
CC	1	66	c1	2434	398
			c2	2331	871
			c3	2979	—
			c4	2468	—
			c5	2425	—
			c6	2711	—
			c7	2909	—
			c8	2411	—
			c9	2934	—
			c10	2163	—
		67	Mittelwert	2576,5	634,5
			Standardabweichung [rfu]	285,22	334,46
			Mittelwert X-Achse [bp]	161,12	163,02
		67	c1	2547	—
			c2	2486	—
			c3	2350	—
			c4	2679	—
			c5	2401	—
			c6	2646	—
			c7	3997	—
			c8	3447	—

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Annealing [°C]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
				Blau	Grün
CC	1	67	c9	2365	—
			c10	2582	—
			Mittelwert	2750,0	—
			Standardabweichung [rfu]	540,15	—
			Mittelwert X-Achse [bp]	161,23	—
		68	c11	1776	—
			c12	1694	—
			c13	2277	—
			c14	1992	—
			c15	1925	—
			c16	1825	—
			c17	2002	—
			c18	1940	—
			c19	1525	—
			c20	1921	—
			Mittelwert	1887,7	—
			Standardabweichung [rfu]	201,72	—
			Mittelwert X-Achse [bp]	161,259	—

2.5 Diagramm 5 S.39 - PD1 - Zehnfache Durchführung der Reaktion in Verbindung mit der DNA-Loci-Variante AA, AC und CC unter Verwendung der endgültigen Bedingungen für dieses Primerdesign

Tabelle 22: PD1 - Werte zum Diagramm 5. Durchschnittliche Signalstärke (n = 10) der DNA-Loci-Varianten AA; AC und CC unter Verwendung der endgültigen Bedingungen, die für dieses Primerdesign ermittelt wurden. In die Reaktion ging eine Primer-Konzentration für die Kombination for + revC von 0,04 µM und revA 0,045 µM ein. Die Reaktionen wurden unter gleichen Bedingungen zehnmal durchgeführt (n = 10). Die Amplifikate wurden bei einer Annealing-Temperatur von 67°C und innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
			Blau	Grün
AA	1	a1	—	1006
		a2	—	259
		a3	—	745
		a4	—	640
		a5	—	627
		a6	—	1053
		a7	—	655
		a8	—	781
		a9	—	690
		a10	—	699
AC	1	Mittelwert	—	715,5
		Standardabweichung [rfu]	—	218,57
		Mittelwert X-Achse [bp]	—	163,08
		b1	881	1141
		b2	847	811
		b3	705	797
		b4	926	694
		b5	668	885
		b6	638	910
		b7	661	825
		b8	616	555

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
			Blau	Grün
AC	1	b9	1094	1095
		b10	819	886
		Mittelwert	785,5	859,9
		Standardabweichung [rfu]	154,63	171,96
		Mittelwert X-Achse [bp]	161,14	163,09
		Anteil [%] Grün von Blau	109,47	
CC		c1	2547	—
		c2	2486	—
		c3	2350	—
		c4	2679	—
		c5	2401	—
		c6	2646	—
		c7	3997	—
		c8	3447	—
		c9	2365	—
		c10	2582	—
	Mittelwert	2750,0	—	
	Standardabweichung [rfu]	540,10	—	
	Mittelwert X-Achse [bp]	161,23	—	

2.6 Diagramm 6 S.42 - PD2 - Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revC_tail-Konzentrationen

Tabelle 23: PD2 - Werte zum Diagramm 6. Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei verschiedenen revC_tail-Konzentrationen. Die Reaktionen wurden unter Verwendung von 2 ng DNA bei gleichen Bedingungen einmal durchgeführt (n = 1). Die Primer-Konzentration der Primer for + revA_tail betrug in allen Reaktionen 0,04 µM. Die Konzentration des Primers revC_tail wurde von 0,03 bis 0,04 µM variiert. Die Annealing-Temperatur betrug in den ersten fünf Zyklen 66°C und ab dem sechsten Zyklus 69°C. Das Produkt wurde innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

DNA-Loci-Variante	Primer-Konzentration [µM]	DNA [ng]	Proben- Bez.	Y-Achse [rfu]	
				Blau	Grün
AC	0,03	2	B1	1686	4069
	0,035		B3	3714	5194
	0,04		B5	4939	5867

2.7 Diagramm 7 S.43 - PD2 - Nachweis des Ausfalls durch zehnfache Durchführung der Reaktion bei gleichen Bedingungen unter Verwendung der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC

Tabelle 24: PD2 - Werte zum Diagramm 7. Nachweis des Ausfalls durch zehnfache Durchführung der Reaktion bei gleichen Bedingungen unter Verwendung der DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC. Die Reaktion wurde unter Verwendung von 2 ng DNA bei gleichen Bedingungen zehnmal durchgeführt (n = 10). Die Primer-Konzentration der Primer for + revA_tail betrug in allen Reaktionen 0,04 µM und die des Primers revC_tail 0,035 µM. Die Annealing-Temperatur betrug in den ersten fünf Zyklen 66°C und ab dem sechsten Zyklus 69°C. Das Produkt wurde innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
			Blau	Grün
AA	2	A1	—	811
		A2	—	487
		A3	—	592
		A4	—	559

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
			Blau	Grün
AA	2	A5	—	638
		A6	—	763
		A7	—	690
		A8	—	663
		A9	—	529
		A10	—	621
		Mittelwert	—	635,3
AC	2	Standardabweichung [rfu]	—	101,18
		Mittelwert X-Achse [bp]	—	169,01
		B1	732	543
		B2	454	462
		B3	594	427
		B4	459	344
		B5	351	256
		B6	702	594
		B7	711	662
		B8	388	303
		B9	222	233
		B10	439	424
CC	2	Mittelwert	505,2	424,8
		Standardabweichung [rfu]	172,33	144,11
		Mittelwert X-Achse [bp]	165,92	169,09
		Anteil [%] Grün von Blau	84,0855107	
CC	2	C1	—	—
		C2	1854	—
		C3	1536	—
		C4	1387	—
		C5	1435	—
		C6	1809	—
		C7	1599	—

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
			Blau	Grün
CC	2	C8	1423	—
		C9	1211	—
		C10	1233	—
		Mittelwert	1498,55556	—
		Standardabweichung [rfu]	226,276441	—
		Mittelwert X-Achse [bp]	165,802222	—

2.8 Diagramm 8 S.44 - PD2 - Durchschnittliche Signalstärke der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen

Tabelle 25: PD2 - Werte zum Diagramm 8. Durchschnittliche Signalstärke (n = 3) der DNA-Loci-Variante AC bei unterschiedlichen DNA-Mengen (2 ng; 1 ng; 0,5 ng; 0,25 ng; 0,125 ng). Die Reaktionen wurden bei gleichen Bedingungen dreimal durchgeführt (n = 3). Die Primer-Konzentration der Primer for + revA_tail betrug in allen Reaktionen 0,04 µM und die des Primers revC_tail 0,035 µM. Die Annealing-Temperatur betrug in den ersten fünf Zyklen 66°C und ab dem sechsten Zyklus 69°C. Das Produkt wurde innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert.

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
			Blau	Grün
AC	2	B1.1	4599	4929
		B1.2	6813	5501
		B1.3	5811	4571
		Mittelwert	5741,0	5000,3
		Standardabweichung [rfu]	1108,66	469,09
		Mittelwert X-Achse [bp]	165,81	169,00
		Anteil [%] Grün von Blau	87,1	
	1	B2.1	1935	1996
		B2.2	2423	3115
		B2.3	2859	2723
		Mittelwert	2405,67	2611,33
		Standardabweichung [rfu]	462,2438	567,7960

DNA-Loci-Variante	DNA [ng]	Probenbezeichnung	Y-Achse [rfu]	
			Blau	Grün
AC	1	Mittelwert X-Achse [bp]	165,86	169,05
		Anteil [%] Grün von Blau	108,6	
	0,5	B3.1	2326	1837
		B3.2	1294	1728
		B3.3	810	666
		Mittelwert	1476,67	1410,33
		Standardabweichung [rfu]	774,3315	646,9114
		Mittelwert X-Achse [bp]	165,88	169,08
		Anteil [%] Grün von Blau	95,51	
	0,25	B4.1	534	454
		B4.2	335	752
		B4.3	707	160
		Mittelwert	525,3	455,3
		Standardabweichung [rfu]	186,15	296,00
		Mittelwert X-Achse [bp]	165,85	169,05
		Anteil [%] Grün von Blau	86,68	
	0,125	B5.1	533	202
		B5.2	200	392
		B5.3	470	200
		Mittelwert	401,0	264,67
		Standardabweichung [rfu]	176,90	110,2784
		Mittelwert X-Achse [bp]	165,89	169,06
		Anteil [%] Grün von Blau	66,0	

3 Sequenzdetails aus der Sequenzierung nach Sanger

Tabelle 26: Sequenzen der Sequenzierungsreaktion für die DNA-Loci-Varianten AA, AC und CC.

DNA-Loci-Variante	Sequenz
AA	5' -GTGGCTTCAGTCGGCAACGCAAGCGCAAGTTGTCCTTCCGCAGGCGCACGGACA[A]GGGTGAGGCGGGGAGGGGAGG-3'
AC	5' -GTGGCTTCAGTCGGCAACGCAAGCGCAAGTTGTCCTTCCGCAGGCGCACGGACA[A/C]GGGTGAGGCGGGGAGGGGAGG-3' 3' -CACCGAAGTCAGCCGTTGCGTTTCGCGTTCAACAGGAAGGCGTCCGCGTGCCTGT[T/G]CCCACTCCGCCCCCTCCCCTCC-5'
CC	5' -GTGGCTTCAGTCGGCAACGCAAGCGCAAGTTGTCCTTCCGCAGGCGCACGGACA[C]GGGTGAGGCGGGGAGGGGAGG-3' 3' -CACCGAAGTCAGCCGTTGCGTTTCGCGTTCAACAGGAAGGCGTCCGCGTGCCTGT[G]CCCACTCCGCCCCCTCCCCTCC-5'

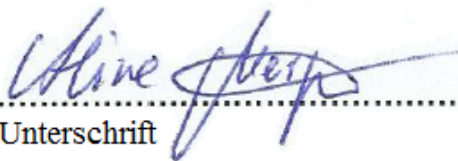
Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 25.08.2013


Unterschrift

Aline Mergner